

**Aus der Klinik für Innere Medizin I  
(Direktor: Prof. Dr. S. Schreiber)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts Universität zu Kiel**

**TOPOISOMERASE II ALPHA UND  
MINICHROMOSOME MAINTENANCE PROTEIN 6  
EXPRESSION  
IM KOLOREKTALEN KARZINOM:  
EINE KLINISCH-IMMUNHISTOCHEMISCHE  
UNTERSUCHUNG VON 619 PATIENTEN**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**SALEH NAZZAL**

aus Zefat

Kiel 2013

1. Berichterstatter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. habil. Carsten Schrader

2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. med. Wolfram Klapper

Tag der mündlichen Prüfung: 13.03.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 16.12.2012

gez. Herr Prof. Dr. Johann Roider

Meinen Eltern  
Muhammed & Raya  
meiner Frau Afaf  
und  
meinen Kindern  
Wajeesh & Sara  
in Liebe und Dankbarkeit  
gewidmet

# INHALTSVERZEICHNIS

Seite	
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>4</b>
2.1 Patienten	4
2.2 Erstellung der Schnittpräparate	4
2.3 Morphologische und immunhistochemische Untersuchung	4
2.3.1 Hämatoxylin und Eosin Färbung	4
2.3.2 Immunhistochemische Untersuchung	5
2.3.3 Eindeckung der gefärbten Schnitte	6
2.4 Auswertungen der immunhistochemischen Untersuchung	6
2.5 Statistische Auswertung	7
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>8</b>
3.1 Charakteristika der Patienten	8
3.2 Klinisch-pathologische Befunde des gesamten Kollektivs	8
3.2.1 Alter	8
3.2.2 Geschlecht	10
3.2.3 Tumorlokalisation	11
3.2.4 Stadien	11
3.2.5 Histologischer Grad	13
3.2.6 Histologischem Subtyp	14
3.2.7 Resektionsstatus	15
3.3 Immunhistochemische Befunde der Topoisomerase II $\alpha$ Expression	18
3.3.1 Alter	18
3.3.2 Tumorlokalisation	18
3.3.3 Stadien	19
3.3.4 Histologischer Grad	19
3.3.5 Histologischer Typ	20
3.3.6 Resektionsstatus	20

3.3.7 Korrelation zum progressionsfreien- und Gesamtüberleben	23
3.3.7.1. Alter	25
3.3.7.2 Tumorlokalisation	25
3.3.7.3 Stadien	26
3.3.7.4 Histologischer Grad	27
3.3.7.5 Histologischer Typ	28
3.3.7.6 Resektionsstatus	29
3.4 Immunhistochemische Befunde der Minichromosome Maintenance	
Protein 6 Expression	32
3.4.1 Alter	32
3.4.2 Tumorlokalisation	32
3.4.3 Stadien	33
3.4.4 Histologischer Grad	33
3.4.5 Histologischer Typ	34
3.4.6 Resektionsstatus	35
3.4.7 Korrelation zum progressionsfreien- und Gesamtüberleben	37
3.4.7.1 Alter	38
3.4.7.2 Tumorlokalisation	39
3.4.7.3 Stadien	40
3.4.7.4 Histologischer Grad	40
3.4.7.5 Histologischer Typ	41
3.4.7.6 Resektionsstatus	43
3.5 Vergleich der MCM 6 und Topo II $\alpha$ Expression	45
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>48</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>57</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>59</b>
<b>Danksagung</b>	<b>70</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>72</b>
<b>Schriftenverzeichnis</b>	<b>73</b>

## 1. EINLEITUNG

Bösartige Tumoren spielen heute in den Industrienationen eine immer bedeutendere Rolle und sind nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Das Kolorektale Karzinom (KRK) stellt mit einer Inzidenz von ca. 37.000 Fällen bei Männern und 36.000 Fällen bei Frauen zusammen die häufigste maligne Erkrankung in Deutschland dar. Mit ca. 28000 Todesfälle/Jahr gilt es als einer der häufigsten Todesursachen unter der Malignomen (1, 2). Es entsteht fast ausschließlich auf dem Boden eines Adenoms. Hierbei spielt die sogenannte „Adenom-Karzinom-Sequenz“ eine entscheidende Rolle (3). Die Entwicklung eines Karzinoms hängt von verschiedenen Faktoren ab. Dies sind u.a. die Größe des Adenoms, sodass mit steigender Größe das Entartungsrisiko wahrscheinlicher wird. Außerdem spielt die makroskopische Form, der histologische Typ und der Grad der Differenzierung (Grading) des Tumors eine wichtige Rolle (3). Bei den exogenen Faktoren, die eine Entstehung einer Neoplasie fördern, zählen unter anderem die Ernährung, das Rauchen, der Mangel an Bewegung und der Alkoholkonsum wobei keiner dieser Faktoren als alleinige Ursache bei der Entstehung des Karzinoms gehalten wird (4). In den meisten Fällen liegt das Karzinom als Adenokarzinom vor. Weitere seltenere histologische Typen sind das muzinöse Karzinom und das Siegelzellring Karzinom. Die Stadien des KRK, von denen die Prognose und die Therapie entscheidend abhängen, erfolgen nach dem TNM System, das in eine UICC- (Union internationale contre le cancer) Klassifikation umgeschrieben wird. Die Prognose hängt entscheidend von dem Tumorstadium ab, sodass Patienten mit fortgeschrittenen Stadium (Stadium IV) eine schlechtere Prognose haben (5). Es gibt zurzeit keine weiteren guten Parameter zur Beurteilung der Gesamtprognose. Einen kleineren, aber nicht unwichtigen Anteil stellen die hereditären Kolonkarzinome dar. Hier sind die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), die als eine obligate Präkanzerose gilt (1% der gesamten KRK) und das hereditäre non-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC), das Lynch Syndrom, (ca.6% des KRK) zu nennen (6). Zusätzlich kann man bei ca. 20% der Patienten mit KRK genetische somatische Mutationen finden, im Sinne einer genetischer Prädisposition (7).

Bei den hereditären Formen wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Entstehung des Karzinoms und der Effizienz des DNA-Reparatursystems festgestellt. Mutationen in einem dieser sogenannten «mismatch repair»-Gene „MMR“ können

zum Ausfall dieses Reparatursystems führen. Demzufolge ist die Mutationsrate im Tumor um das 1000 fache erhöht und der Tumor wird genetisch instabil (8), die sogenannte Mikrosatelliteninstabilität (MSI) des Tumors. Bei vielen Tumorerkrankungen spielt die Zellteilung (Proliferation) eine entscheidende Rolle. Die Beurteilung der Zellteilung mittels Proliferationsmarker hat heute eine wichtige Bedeutung in der täglichen Routinediagnostik von vielen bösartigen Erkrankungen bekommen. Nachdem monoklonale Antikörper gegen proliferationsassoziierte Proteine entwickelt wurden, wie z.B. Ki-67 (9) oder PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), haben diese Marker einen festen Platz in der täglichen Routinediagnostik zur Beurteilung der Proliferationsrate erhalten. Neben Ki-67 gibt es weitere Proliferationsassoziierte Proteine wie z.B. Topoisomerase II $\alpha$  (Topo. II $\alpha$ ) und Minichromosome Maintenance Proteine 6 (MCM-6), welche einfach mittels Antikörper im paraffineingebetteten formalinfixierten Gewebe nachgewiesen werden können (10, 11). Bei Topoisomerasen handelt es sich um eine Gruppe von 4 essentiellen Enzymen, die für die DNA Topologie wichtig sind (12, 13). Topoisomerasen sind bei dem Replikationsablauf notwendig und sind für das Abwickeln bzw. Schneiden und Wiederverknüpfen von DNA Strängen verantwortlich (14, 15). Heute kann man die Topoisomerase II $\alpha$  gut in paraffineingebettetem Gewebe mittels monoklonaler Antikörper wie mit Ki-S4 nachweisen (10, 16). Die Expression von Topoisomerase II $\alpha$  konnte beim Mammakarzinom und Morbus Hodgkin als prognostischer Marker nachgewiesen werden (17, 18, 19). Eine hohe Topo. II $\alpha$  Expression war bei diesen Erkrankungen mit einem schlechten klinischen Verlauf vergesellschaftet. Es gibt nur wenige Daten an kleinen Kollektiven zur Untersuchung von Topo. II $\alpha$  mittels FISH-Analyse beim Kolorektalen Karzinom. Es gibt keine Daten zum immunhistochemischen Nachweis von Topo. II $\alpha$  in Kolorektalen Karzinom und deren Bedeutung für den klinischen Verlauf.

Minichromosome Maintenance (MCM) Proteine, spielen eine wichtige Rolle bei der Replikation der DNA in eukarionten Zellen, sie sind ein Bestandteil des präreplikativen Komplexes und sind somit auch ein Marker der Zellproliferation. Sie binden vor der DNA Replikation an das Chromatin (20, 21). Ein spezifischer Antikörper gegen MCM6, Ki-MCM6, ist in der Lage das MCM6 Protein in Paraffin eingebettetem formalinfixiertem Gewebe genau nachzuweisen (11, 22, 23). Die klinische Bedeutung von MCM Proteinen als Proliferationsmarker wurde in einigen Studien an unterschiedlichen malignen Tumoren bestätigt (24). Die meisten Studien

über MCM Proteine haben den Subtyp MCM2 untersucht, (24, 25, 26, 27, 28). Es existieren nur wenige über MCM2 und MCM5 Expression bei kolorektalen Karzinom (29, 30). Hierbei wurden nur kleine Kollektive mit 27-96 Patienten untersucht (29, 30, 31) Es wurden jedoch keine Analysen hinsichtlich des progressionsfreien- und Gesamtüberlebens durchgeführt. Nur wenige Studien haben sich mit MCM6 beschäftigt (23, 32). Es gibt keine Untersuchung über MCM6 im kolorektalen Karzinom.

Ziel dieser Studie ist es, die Untersuchung der Proliferations-assoziierten Proteine Topoisomerase II $\alpha$  und MCM6 an Tumorproben von 619 Patienten mit kolorektalen Karzinom zu untersuchen. Die Ergebnisse sollen dann mit dem klinischen Verlauf korreliert werden, speziell ob unterschiedliche Expressionsprofile einen Einfluss auf das progressionsfreie und auf das Gesamtüberleben haben. Zusätzlich werden wir untersuchen, ob die Proliferationsmarker unterschiedlich stark in den klinischen-pathologischen Charakteristika exprimiert werden.



## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Patienten**

Es wurden formalinfixierte, paraffineingebettete Tumorproben von 619 Patienten mit histologisch gesichertem kolorektalem Karzinom (312 Männer, 307 Frauen) untersucht. Das Untersuchungsmaterial stammt aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums-Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel. Die Tumorproben wurden in den Jahren 1994-2007 gewonnen. Zusätzlich wurden klinische und pathologische Daten wie Stadium, Grading, histologischer Subtyp, Therapie, Resektionsstatus nach Operation, Lokalisation des Tumors, Progression-freies- und Gesamtüberleben erhoben.

### **2.2 Erstellung der Schnittpräparate**

Es wurden am Mikrotom (Jung, Heidelberg, Deutschland) 3-5 µm dicke Schnitte angefertigt, die aus in formalinfixierten (10% gepuffertem Formalin-Lösung) und paraffineingebetteten Gewebeproben hergestellt wurden. Die Schnitte wurden zunächst im Wasserbad eingegeben. Dann wurden sie auf beschichtete Objektträger (Histobond, Marienfeld, Deutschland) bei einer Temperatur von 45-55 °C übertragen. Die Paraffinschnitte wurden danach zur Trocknung (24 Stunden) im Wärmeschrank bei 37 °C gelagert.

### **2.3 Morphologische und immunhistochemische Untersuchung**

Die Paraffinschnitte wurden vor Bearbeitung in Xylol für 10 Minuten zur Entparaffinisierung gegeben und dann in 3-Minuten Takt in einer absteigende 100-, 96- und 70- prozentigen Ethanolreihe wieder in ein wässriges Milieu überführt (Rehydrierung).

#### **2.3.1 Hämatoxylin und Eosin Färbung**

Die Schnittpräparate wurden mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt. Die HE-Färbung haben wir zunächst durchgeführt als Kontrolle, zur besseren morphologischen Beurteilung und Vereinfachung der Lokalisation der Tumorareale. Nach der o.g. Rehydratation haben wir die Schnitte für 10 Minuten mit ca. 200 µl Hämatoxylin Lösung inkubiert. Anschließend wurden sie unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten gespült und direkt danach in destilliertes Wasser

gegeben. Die Schnitte wurden danach mit 400 µl Eosin Lösung für 3 Minuten inkubiert und wieder kurz mit destilliertem Wasser gespült. Zum Schluss wurden die Schnitte in einer aufsteigenden 70-, 96- und 100-prozentigen Ethanolreihe eingegeben und für 5 Minuten in Xylol eingelegt.

### **2.3.2 Immunhistochemische Untersuchung**

In unserer Arbeit wurden alle Gewebeproben anhand spezifischer monoklonaler Primär-Antikörper immunhistochemisch nach der Zwei-Schritt indirekten Methode gefärbt. Das Prinzip dieser Methode ist, dass ein spezifischer Primärantikörper an das gewünschte Antigen bindet. Als nächstes inkubiert der enzymmarkierte Sekundärantikörper. Der Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper und nach dem Waschen der Schnitte bleiben nur die Antikörper vorhanden, die an dem Antigen binden. Bei der Gabe des farblosen Substrates wird es von dem Enzym in ein farbiges Enzymprodukt umgewandelt. Als Ergebnis entsteht ein Immunpräzipitat, welches dann das untersuchte Antigen markiert.

Nach der o.g. Rehydrierung war zunächst eine Blockierung der endogenen Peroxidase erforderlich, die vor Beginn der Färbeschritte durchgeführt wurde. Dies ist wichtig damit die endogene Peroxidase nicht mit dem eingegebenen Substrat interagiert. Die Präparate sind deswegen anfänglich für 10 Minuten in einer Mischung aus 4 ml einer 30% Wasserstoffperoxid-Lösung (Merck, Deutschland) und 200 ml Methanol (Merck, Deutschland) inkubiert worden.

Die Detektion von reaktiven Epitopen in fixiertem Material erforderte eine vorherige Antigendemaskierung, das sogenannte antigen retrieval (33). Dieser Schritt ist bei immunhistochemischen Färbungen erforderlich damit die Primärantikörper an das Epitop binden können. Dies wurde durch Kochen der Paraffinschnitte in einer 0,01M Zitratpuffer-Lösung (6,0 pH) für 3 Minuten in einem Dampfkochtopf erreicht. Für die Herstellung der Zitrat Pufferlösung haben wir 10,5 g Zitronensäure-Monohydrat (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) in 5 Liter Aqua dest. gelöst und mit 65ml NaOH auf einen pH-Wert von 6,0 titriert. Direkt danach sind die Schnitte mit Leitungswasser gespült und in Waschpuffer gebracht worden.

Bei Raumtemperatur erfolgte dann die Inkubation der Präparate für 60 Minuten mit 100 µl Primärantikörper. Nach der Inkubation wurden die Präparate in TBS-Puffer (Tris-Buffered Saline) gegeben und anschließend unter fließendem Leitungswasser gespült und zuletzt in Waschpuffer gebracht. Der Waschpuffer (Tris-Buffered Saline-

Puffer = TBS-Puffer) setzte sich zusammen aus 68,5 g TRIS-HCl, 9 g TRIS-NaOH (beide Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) und 87,8 g NaCl (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) zusammengegeben in 10 l Aqua dest. Dann wurde dieses Gemisch mit 1 molaren HCl (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) auf einem pH-Wert von 7,4 titriert. Zur Detektion der Topoisomerase II $\alpha$  wurde der Antikörper Ki-S4 (Institut für Hämatopathologie, UKSH, Campus Kiel) benutzt. Das MCM6 Protein wurde durch den Antikörper Ki-MCM6 nachgewiesen (Institut für Hämatopathologie, UKSH, Campus Kiel).

Wir verwendeten als Sekundärantikörper bei monoklonalen Primärantikörpern das Kaninchen-Anti-Maus-IgG (E354 DAKO, Hamburg, Deutschland). Zur Inkubation der Präparate mit dem Sekundärantikörper wurden sie 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert, mit Leitungswasser gespült und in Waschpuffer gebracht. Anschließend wurde die Schnitte mit 100 $\mu$ l DAB (Diaminobenzidin, DAKO, Hamburg, Deutschland) inkubiert und danach zweimal mit Aqua dest. gespült. Im Anschluss führten wir eine fünfminütige Kerngegenfärbung mit Hämalun nach Mayer durch (Merck, Darmstadt, Deutschland). Zweck der Dehydrierung wurden die gefärbten Präparate nach zehnminütigem Bläuen mit Leitungswasser in einer aufsteigenden 70-, 96- und 100-prozentigen Ethanolreihe eingegeben und für zweimal in Alkohol-Xylol (1:1) eingelegt.

### **2.3.3 Eindeckung der gefärbten Schnitte**

Zum Schluss wurden die Schnitte mit Pertex (Medite, Burgdorf, Deutschland) eingedeckelt. Auf diese Weise sind die gefärbten Präparate bereit zur Auswertung mittels eines Lichtmikroskops (Axioskop 40, Zeiss, Deutschland).

### **2.4 Auswertungen der immunhistochemischen Untersuchung**

Die Präparate wurden ohne jegliche Kenntnisse über klinische Daten der Patienten ausgewertet. In jedem Präparat wurden 500 Tumorzellen in fünf zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern mit 400-facher Vergrößerung mit Hilfe eines Zähllokulars und eines Zellzählers (Counter AC8, Hecht AG, Sondheim, Deutschland) gezählt. Wir haben die Areale mit vielen positiven Zellen d.h. hohen Proliferationsraten, sogenannte Hotspot-Areale, separat berücksichtigt. Es wurde ein Mittelwert der positiven Zellkerne berechnet, wobei nur Färbungen des Zellkerns als positive MCM 6- und Topo II $\alpha$ - Expression bewertet wurden.

## **2.5 Statistische Auswertung**

Es wurde eine Datenbank in einer Exceldatei angelegt. Die statistische Analyse erfolgte mit der Graphic Pad Prism-Software (Version 3.02). Der Vergleich der Expressionsraten zweier Proliferationsmarker erfolgte mit dem Fisher-Test. Für Univarianzanalysen der Proliferationsmarker im Hinblick auf das Gesamtüberleben sowie das progressionsfreies Überleben wurde auf die Kaplan-Meier-Methode zurückgegriffen.

### **3. ERGEBNISSE**

#### **3.1 Charakteristika der Patienten**

Unter den 619 Patienten waren insgesamt 312 (50.4%) Männer und 307 (49.6%) Frauen. Der Medianwert des Alters betrug 65.2 Jahre (Durchschnitt: 66 Jahre, Spannweite: Minimum 29 Jahre- Maximum 102 Jahre). Bei den meisten Patienten verfügten wir über die klinischen Daten wie Alter, Tumorlokalisation, Stadium und Therapie. Des weitem besaßen wir histologische Daten der Patienten wie histologischer Grad (Grading) und histologischer Subtyp, Resektionsstatus nach Operation (R-Status). Detaillierte Angaben über das Patientenkollektiv finden sich in Tabelle 1.

#### **3.2 Klinisch-pathologische Befunde des gesamten Kollektivs**

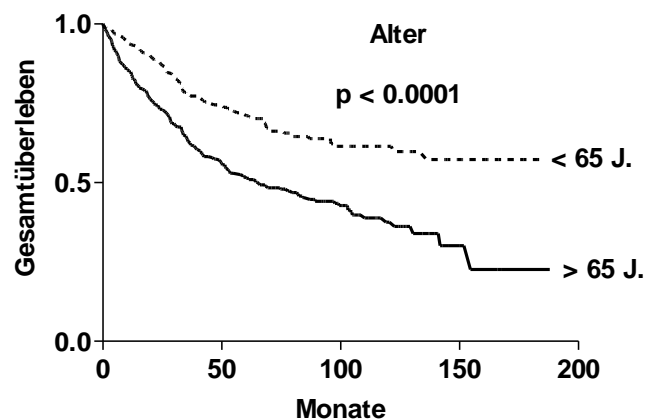
Im Folgenden werden die unterschiedlichen klinisch-pathologischen Befunde näher dargestellt, speziell auf das progressionsfreie- und Gesamtüberleben untersucht. Dadurch kann entschieden werden, ob bestimmte Merkmale einen Einfluss auf die Prognose haben. Als Zusammenfassung der Ergebnisse siehe Tabelle 2.

##### **3.2.1 Alter**

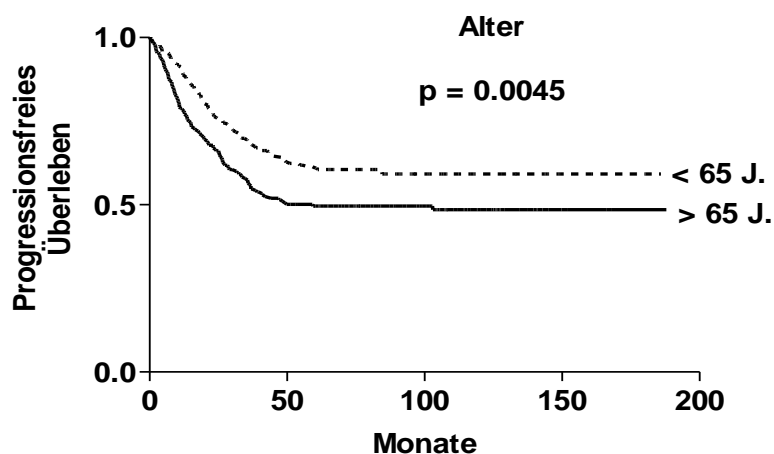
Bei dem Alter haben wir einen cut off von 65 Jahre gesetzt, übereinstimmend des Medians (65.2 Jahre) bzw. des Mittelwertes (66 Jahre). Es gab einen signifikanten Unterschied bei dem Gesamtüberleben. Patienten unter 65 Jahre hatten eine bessere Prognose. Das mediane Gesamtüberleben ist dabei nicht erreicht worden, wohingegen Patienten über 65 Jahre einen Wert von 65.6 Monate hatten ( $p < 0.0001$ , Abbildung 1). Beim Betrachten des progressionsfreien Überlebens haben die jüngeren Patienten unter 65 Jahre später ein Rezidiv. Der mediane Wert ist dabei nicht erreicht worden, wohingegen bei älteren Patienten früher ein Rezidiv auftritt mit einem medianen Wert von 59.5 Monaten ( $p = 0.0045$ ; Abbildung 2).

**Tabelle 1.** Charakteristika der 619 Patienten

<b><i>Merkmal</i></b>	<b><i>n</i></b>	<b><i>(%)</i></b>
<u>Gesamtanzahl der Patienten:</u>	619	(100%)
<u>Alter:</u>		
≥65 .Lebensjahr	315	(50.8%)
<65. Lebensjahr	303	(48.9%)
nicht bekannt	1	(0.16%)
<u>Geschlecht:</u>		
männlich	312	(50.4%)
weiblich	307	(49.5%)
<u>Lokalisation:</u>		
Zäkum	20	(3.2%)
Kolon ascendenz	132	(21%)
Kolon transversum	20	(3.2%)
Kolon descendenz	32	(5.2%)
Sigma	160	(25.9%)
Rektum		
proximal	86	(13.9)
medium	113	(18.3%)
distal	48	(7.8%)
nicht bekannt	8	(1.3%)
<u>TNM-Stadium:</u>		
I	133	(21.5%)
II	164	(26.5%)
III	199	(32.1%)
IV	117	(18.9%)
nicht bekannt	7	(0.11%)
<u>Histologischer Grad:</u>		
I	10	(1.6%)
II	505	(81.6%)
III	102	(16.5%)
nicht bekannt	2	(0.32%)
<u>Histologischer Typ:</u>		
Adenokarzinom	525	(84.9%)
Muzinöses Karzinom	74	(12%)
Siegelzellring Karzinom	7	(0.11%)
nicht bekannt	13	(2.1%)
<u>Resektion:</u>		
R0	573	(92.6%)
R1	14	(2.3%)
R2	18	(2.9%)
nicht bekannt	14	(2.3%)
<u>Therapie:</u>		
OP alleine	229	(48.3%)
OP + Chemo, 5-FU	61	(9.9%)
OP + Chemo, Folfox oder Folfiri	15	(2.4%)
OP + Chemo mit Antikörper	8	(1.3%)
OP + Chemo, Substanz nicht bekannt	52	(8.4%)
OP + Radiochemo	111	(17.9%)
OP + nur Radiatio	10	(1.9%)
OP + nachfolgende Therapie unbekannt	132	(21.3%)



**Abbildung 1.** Darstellung des Gesamtüberlebens des gesamten Kollektivs bei unterschiedlichen Alter anhand einer Kaplan-Meier Analyse.



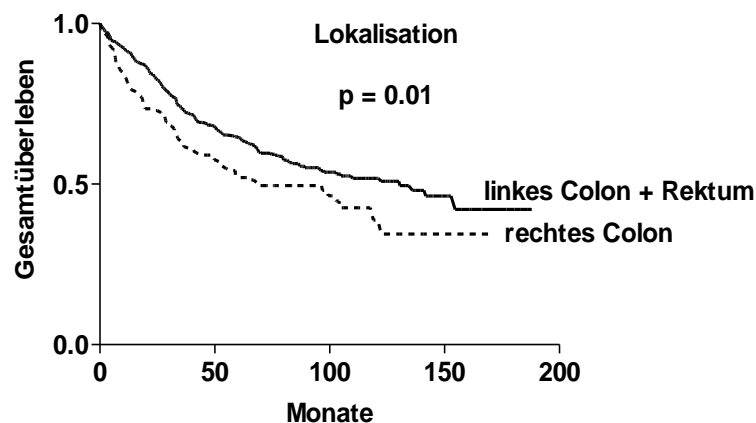
**Abbildung 2.** Darstellung des progressionsfreien Überleben des gesamten Kollektivs bei unterschiedlichen Alter anhand einer Kaplan-Meier Analyse.

### 3.2.2 Geschlecht

Wir haben das progressionsfreie und Gesamtüberleben in Abhängigkeit vom Geschlecht untersucht. Weder bei dem progressionsfreien Überleben ( $p=0.2176$ ) noch bei dem Gesamtüberleben ( $p=0.9611$ ) konnten wir einen signifikanten Unterschied bei den beiden Geschlechtern finden.

### 3.2.3 Tumorlokalisation

Bei der Tumorlokalisation haben wir zwei Gruppen gebildet. Die erste Gruppe besteht aus dem rechten Kolon, speziell dem Zäkum, Kolon ascendenz und Kolon transversum. Die zweite Gruppe wird vom Rektum und dem linken Kolon gebildet. Das letztgenannte beinhaltet Kolon descendenz sowie das Sigma. Für diese Einteilung konnten wir zeigen, dass es einen signifikanten Unterschied bei dem Gesamtüberleben gibt. Mit einem p-Wert von 0.01 haben Kolonkarzinome, die im rechten Kolon lokalisiert sind, eine schlechtere Prognose. Das mediane Gesamtüberleben beträgt 69.5 Monate. Das Rektum und das linke Kolon haben ein medianes Gesamtüberleben von 130.5 Monaten (Abbildung 3). Für das progressionsfreie Überleben könnten wir keinen signifikanten Unterschied für die verschiedenen Lokalisation finden ( $p=0.2985$ ).

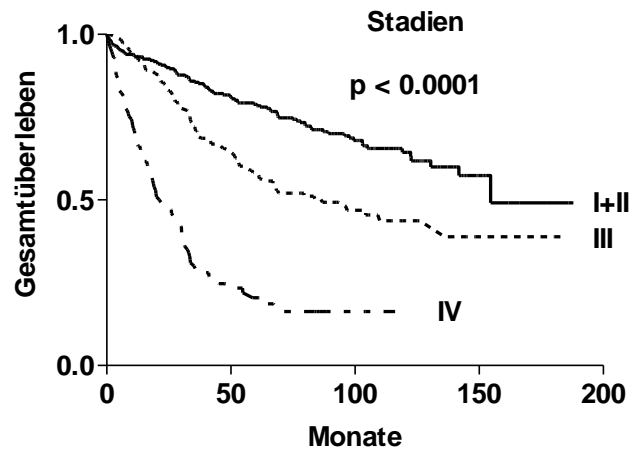


**Abbildung 3.** Darstellung des Gesamtüberlebens im Verhältnis zur Tumorlokalisation

### 3.2.4 Stadien

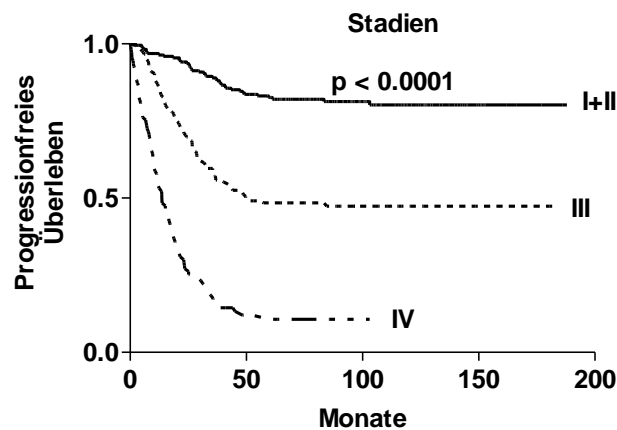
Wir haben die vier Stadien (I-IV) in drei Kategorien klassifiziert. Da es keinen signifikanten Unterschied zwischen Stadium I und II bestand haben wir die beiden Stadien in eine einheitliche Gruppe zusammengestellt. Stadium III und IV stellen jeweils eigenständige Gruppen dar (Abbildung 4). Mit einem p-Wert von  $<0.0001$  ist ein signifikanter Unterschied angesichts des Gesamtüberlebens zwischen den drei Gruppen zu sehen. Stadium I und II zeigten die beste Prognose mit einem medianen Gesamtüberleben von 154.6 Monaten. Stadium III hat einen Wert von 87 Monaten. Mit einem medianen Gesamtüberleben von 22 Monaten haben die Patienten im Stadium IV die schlechteste Prognose.





**Abbildung 4.** Kaplan-Meier Analyse zur Darstellung der Zusammenhang zwischen Gesamtüberleben in den unterschiedlichen Stadien.

Wir konnten weiterhin zeigen, dass das progressionsfreie Überleben in höheren Stadien eine höhere Wahrscheinlichkeit hatte (Abbildung 5). Bei lokalisierten Stadien (I+II) ist ein medianer Wert nicht erreicht. Bei lokal-fortgeschrittenen Stadien (III) haben die Patienten einen medianen Wert von 49.8 Monaten und beim metastasierten Stadien IV einen medianen Wert von 13.7 Monaten ( $p < 0.0001$ ).

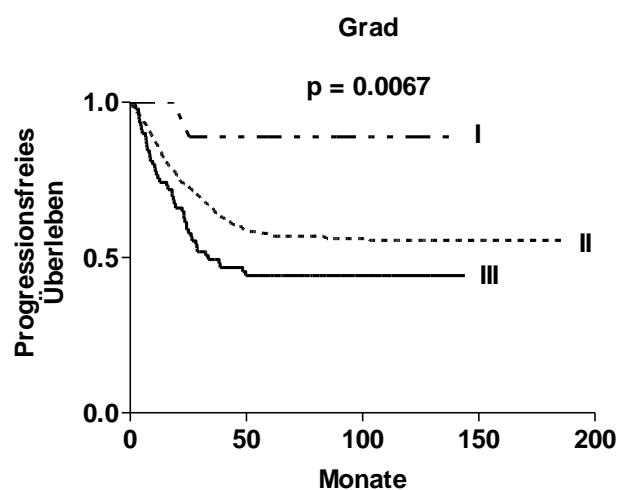


**Abbildung 5.** Kaplan-Meier Analyse zur Darstellung der Zusammenhang zwischen dem progressionsfreien Überleben in den unterschiedlichen Stadien.

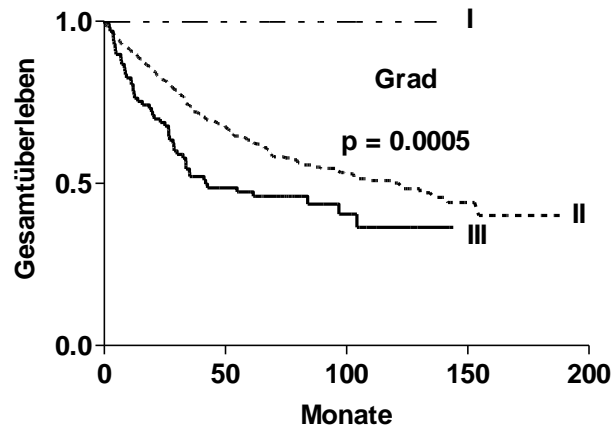
### 3.2.5 Histologischer Grad.

Beim Betrachten der Analyse des histologischen Grad wird deutlich, dass höhere Grade, die schlecht differenzierten Tumoren entsprechen, eine signifikant schlechtere Prognose haben. Dies zeigt sich in den früher auftretenden Progress, sowie dem kürzeren Gesamtüberleben. Patienten mit Grad III (schlechteste histologische Differenzierung) haben ein medianes progressionsfreies Überlebens von 33.6 Monaten und damit die schlechteste Prognose. Bei Patienten mit Grad II sowie Grad I ist der Medianwert nicht erreicht. Die Kaplan Meier Analyse zeigt bei Patienten mit Grad I eine deutlich bessere Prognose als die Patientin mit Karzinomen die Grad II und III haben ( $p=0.0067$ , Abbildung 6).

Weiterhin haben wir die unterschiedlichen Grade mit dem medianen Gesamtüberleben verglichen. Bei gut differenzierten Grad I ist der mediane Wert nicht erreicht. Bei mitteldifferenzierten Grad II haben die Patienten einen medianen Wert des Gesamtüberlebens von 122.4 Monaten und bei den schlechtesten differenzierten Tumoren Grad III haben die Patienten einen Wert von 33.6 Monaten ( $p=0.0005$ , Abbildung 7)



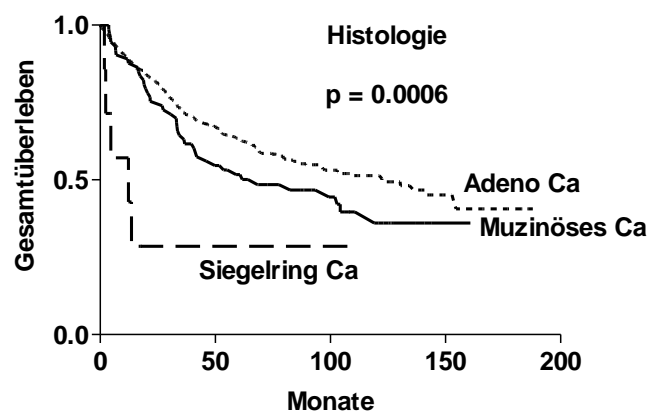
**Abbildung 6:** Kaplan-Meier Analyse zur Darstellung der Zusammenhang zwischen progressionsfreien Überleben in den unterschiedlichen histologischen Graden.



**Abbildung 7:** Kaplan-Meier Analyse zur Darstellung der Zusammenhang zwischen Gesamtüberleben in den unterschiedlichen histologischen Grad.

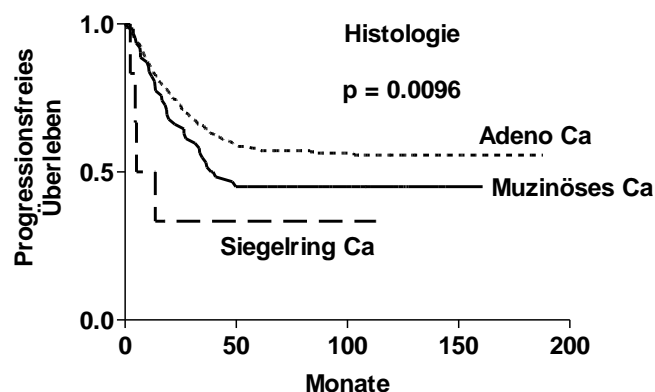
### 3.2.6 Histologischer Typ

Es wurden drei histologische Subtypen untereinander verglichen. Der häufigste Typ, das Adenokarzinom (84,9% der Fälle), hat die beste Prognose mit einer medianen Überlebensrate von 122.6 Monaten. Der nächst häufigste Typ, das muzinöse Karzinom (12%), hat eine schlechtere Prognose mit einen mittleren Gesamtüberleben von 68.3 Monaten. Das Siegelzellringkarzinom, das am seltensten (0.11%) vorkommt, hat eine sehr schlechte Prognose mit einem medianen Gesamtüberleben von nur 12.3 Monaten ( $p=0.0006$ , Abbildung 8)



**Abbildung 8.** Kaplan-Meier Analyse zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen Gesamtüberleben zu den unterschiedlichen histologischen Subtypen.

Um zu wissen wie die histologischen Subtypen das Fortschreiten der Erkrankung beeinflussen, haben wir die Subtypen mit dem progressionsfreien Überleben in Zusammenhang gebracht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Erkrankung am schnellsten bei dem Siegelzellringkarzinom fortschreitet mit einem medianen Wert von 9.4 Monaten. Bei dem nächsten Typ, dem muzinösen Typ, schreitet die Erkrankung langsamer fort (medianer Wert 40.7 Monate). Bei dem häufigsten Typ, dem Adenokarzinom ist der mediane Wert nicht erreicht (Abbildung 9,  $p=0.0096$ ).

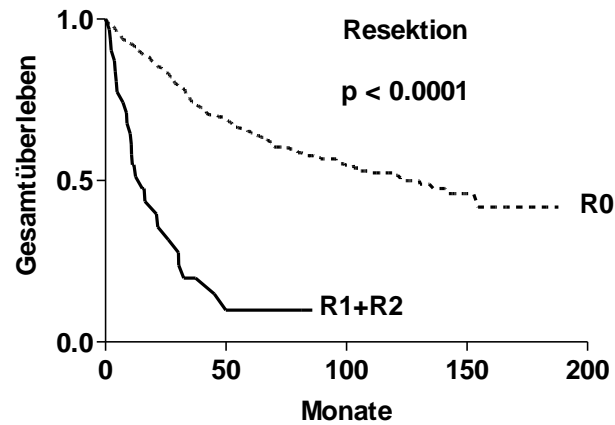


**Abbildung 9.** Kaplan-Meier Analyse zur Darstellung der Zusammenhang zwischen progressionsfreies Überleben zu den unterschiedlichen histologischen Subtypen.

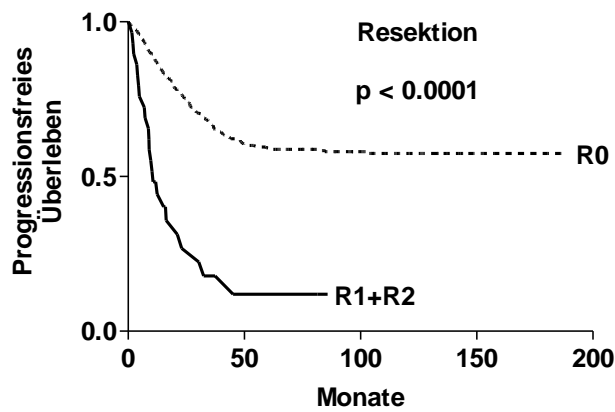
### 3.2.7 Resektionsstatus

Es wurden von dem Resektionsstatus nach Operation zwei Kategorien erstellt. Die erste bestand aus R0, welches einer kompletten Resektion, d.h. tumorfreier Restbestand entspricht. Die andere Gruppe wurde von R1 und R2 gebildet. Hierbei handelt es sich um einen mikroskopischen bzw. makroskopischen Restbestand des Tumors. Wir konnten dabei nachweisen, dass das Gesamtüberleben von dem Resektionsstatus abhängt. Patienten mit Tumoren, die R0 reseziert wurden, hatten eine eindeutig bessere Prognose mit einem medianen Wert von 122.6 Monaten. Die andere Patientengruppe (R1+R2) hat eine dramatisch schlechtere Prognose mit einem medianen Gesamtüberleben von 15.3 Monaten ( $p<0.0001$ , Abbildung 10).

Bei dem Vergleich des Resektionsstatus zeigte, dass Patienten mit R0 Status die beste Prognose haben, der mediane Wert wurde nicht erreicht. Bei den R1 und R2 Status haben die Patienten einen medianen Wert von 10.7 Monaten bis zum Progress der Erkrankung ( $p<0.0001$ , Abbildung 11).



**Abbildung 10.** Verhältnis des Gesamtüberlebens zum Resektionsstatus des gesamten Patientenkollektives anhand einer Kaplan Meier Analyse



**Abbildung 11.** Verhältnis des progressionsfreien Überleben zum Resektionsstatus des gesamten Patientenkollektives anhand einer Kaplan Meier Analyse

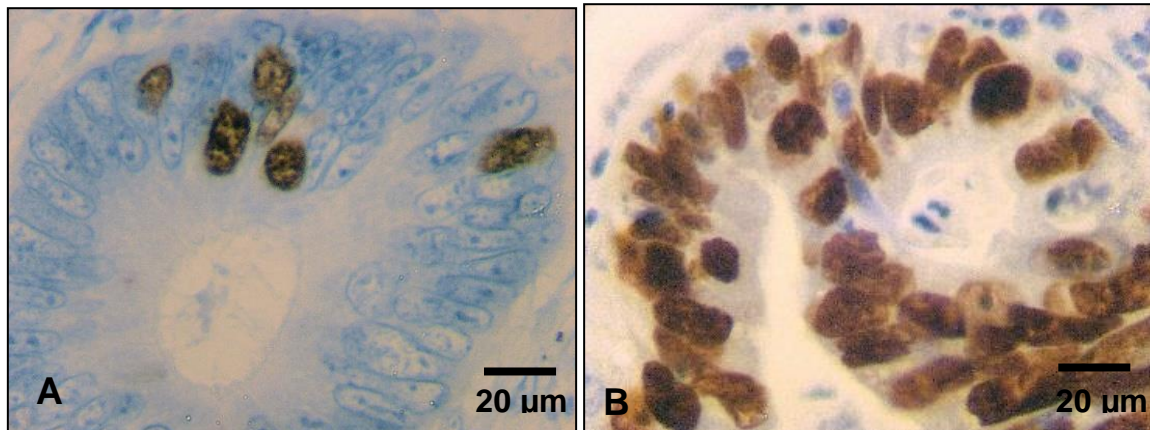
**Tabelle 2.** Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben in Abhängigkeit von klinisch-pathologischen Charakteristika des gesamten Kollektivs

Merkmal Wert	Patienten Anzahl	OS Monate	P-Wert	PFÜ Monate	p-
<u>Alter:</u>					
≥65 .Lebensjahr	315 (50.8%)	65.6	<0.0001	59.5	
0.0045					
≤65. Lebensjahr	303 (48.9%)	n.e.		n.e.	
<u>Geschlecht:</u>					
männlich	312 (50.4%)	119.1	0.9611	n.e.	0.2176
weiblich	307 (49.5%)	104.3		n.e.	
<u>Lokalisation:</u>					
rechtes Kolon	172 (27.8%)	130.5	0.01	n.e.	
0.2985					
Rektum+ linkes Kolon	439 (70.1%)	69.5		n.e.	
nicht bekannt	8 (1.3%)				
<u>TNM-Stadium:</u>					
I+II	297 (48%)	154.6	< 0.0001	n.e.	<
0.0001					
III	199 (32.1%)	87.0		49.8	
IV	117 (18.9%)	22.1		13.7	
nicht bekannt	7 (0.16%)				
<u>histologischer Grad:</u>					
I	10 (1.6%)	n.e.	0.0005	n.e.	
0.0067					
II	487 (78.7%)	122.4		n.e.	
III	99 (16.1%)	41.8		33.6	
nicht bekannt	23 (3.7%)				
<u>histologischer Typ:</u>					
Adeno	525 (84.9%)	122.6	0.0006	n.e.	
0.0096					
muzinös	74 (12%)	68.3		40.7	
Siegelzellring	7 (0.11%)	12.3		9.4	
nicht bekannt	13 (2.1%)				
<u>Resektion:</u>					
R0	573 (92.6%)	15.3	< 0.0001	n.e.	<
0.0001					
R1+R2	32 (5.2%)	122.6		10.7	
nicht bekannt	14 (2.3%)				

Abkürzungen: OS= Gesamtüberleben; PFÜ= progressionfreies-Überleben; n.e. = nicht erreicht

### 3.3 Immunhistochemische Befunde der Topoisomerase II $\alpha$ - Expression

Bei der Beurteilung waren aus technischen Gründen nicht alle Schnitte ausreichend gut beurteilbar. Von den gesamten 430 gut auswertbaren Präparaten sind 267 Fälle mit einer hohen Topo. II $\alpha$  positiven Kernreaktion ( $\geq 50\%$  der Zellen sind positiv) ausgefallen. Bei der anderen Patientengruppe, in 163 der Fälle, haben sie eine niedrige Expressionsrate ( $< 50\%$  der Zellen sind positiv). In Abbildung 12 werden die unterschiedlichen Expressionsraten anhand eines histologischen Bildes dargestellt.



**Abbildung 12:** Immunhistochemischer Nachweis von Topoisomerase II $\alpha$  in kolorektalen Karzinom, braun gefärbt sind positive Zellen, Vergrößerung x400, **A:** Expressionsrate  $< 50\%$ . **B:** Expressionsrate  $> 50\%$

Für das gesamte Kollektiv haben wir eine mittlere Expressionsrate Topoisomerase II $\alpha$  von 52.0% (Minimum 8.8%, Maximum 84.4%).

#### 3.3.1 Alter

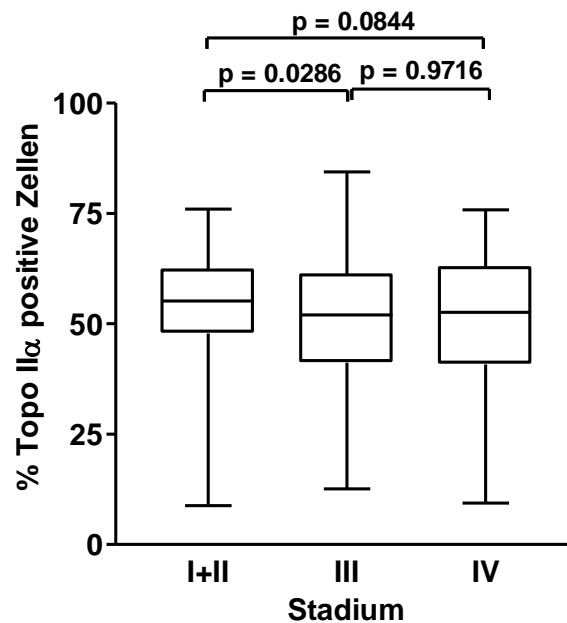
Beim Betrachten der Expressionsrate der Topo. II $\alpha$  und dem Alter wird deutlich dass es eine signifikante Korrelation zwischen die beiden Variablen gibt. Dabei ist die Expression bei jüngeren Patienten ( $< 65$  Jahre) wenig höher (56.2%) als bei Älteren (52.0%,  $p= 0.0044$ ).

#### 3.3.2 Tumorlokalisation

Bei den Subgruppen der Lokalisationen in Korrelation zur Topo. II $\alpha$  Expressionsrate konnten wir keinen signifikanten Unterschied finden. Für das rechte Kolon zeigte sich einen Median der Expressionsrate von 54.2% und für das linke Kolon 53.5% ( $p=0.932$ ).

### 3.3.3 Stadien

Bei den unterschiedlichen Stadien zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Topo. II $\alpha$  Expressionsrate zwischen dem Stadium I+II im Vergleich zu III (Median der Expressionsrate 55.2% gegenüber 52.0%,  $p=0.0286$ ). Beim Vergleich des Stadiums III mit IV zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Median der Expressionsrate 52.0% gegenüber 52.6%,  $p=0.9716$ ).

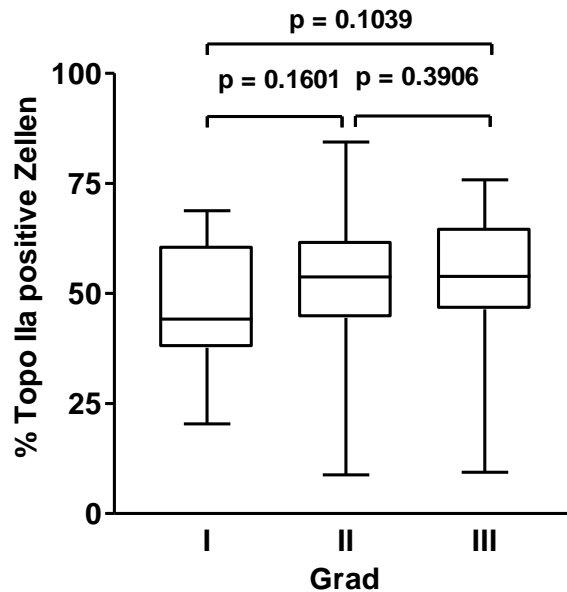


**Abbildung 13:** Box Plot Analyse der Topoisomerase II $\alpha$  in kolorektalen Karzinom in unterschiedlichen Stadien mit Spannweite, Median und oberen und unteren Quartil

### 3.3.4 Histologischer Grad

Die Topo. II $\alpha$  Expressionsrate zeigte bei den unterschiedlichen histologischen Grad keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 14).





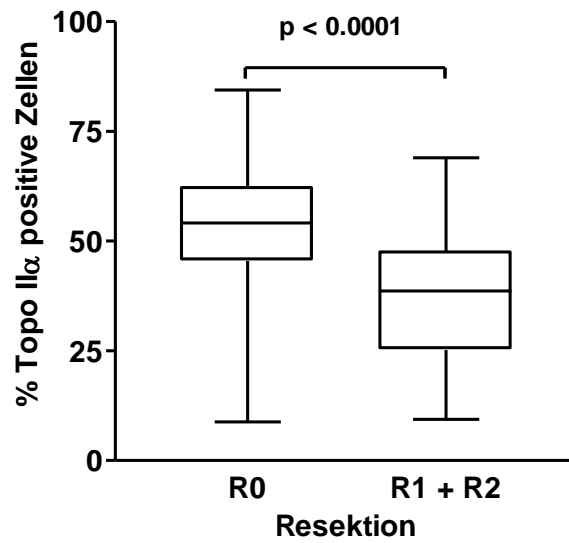
**Abbildung 14:** Box Plot Analyse der Topoisomerase II $\alpha$  in kolorektalen Karzinom in unterschiedlichen histologischen Graden mit Spannweite, Median und oberen und unteren Quartil

### 3.3.5 Histologischer Typ

Für den Vergleich der Expressionsrate Topo. II $\alpha$  und dem histologischen Typ zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Adenokarzinom und dem muzinösen Karzinom (Medianwert der Expressionsrate von 54.1% für das Adenokarzinom gegenüber 51.4% für das muzinöse und Sieglring-Karzinom,  $p=0.0413$ ).

### 3.3.6 Resektionsstatus

Die Topo. II $\alpha$  Expressionsrate ist vom Resektionsstatus abhängig (Abbildung 15). Es gab einen signifikanten Unterschied bei der Expressionsrate zwischen Tumor freier Resektion, der sogenannten R0 Resektion mit einem medianen Wert von 54.1% im Vergleich zur inkompletten Resektion der R1 und R2 Situation mit einem Medianwert der Expressionrate von 38.9% ( $p<0.0001$ ).



**Abbildung 15:** Box Plot Analyse der Topoisomerase II $\alpha$  in kolorektalen Karzinom in unterschiedlichen Resektionssituationen post OP mit Spannweite, Median und oberen und unteren Quartil

**Tabelle 3.** Topo. II $\alpha$  Expressionsrate bei unterschiedlichen klinischen und histologischen Merkmalen

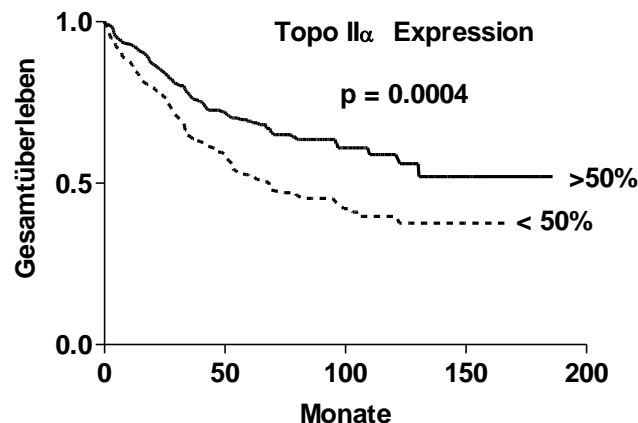
<u>Merkmal</u>	<u>n</u>	<u>% Topo. II<math>\alpha</math> Expression</u>			
		MW $\pm$ SD	MD	Range	p-Wert
<u>Alter:</u>					
<65 LJ	211	53.0 $\pm$ 12.2	56.2	14.4 - 76.0	0,0044
>65 LJ	218	50.2 $\pm$ 14.2	52.0	8.8 - 84.4	
<u>Lokalisation:</u>					
rechtes Kolon	116	51.8 $\pm$ 14.5	54.2	15.0 – 84.4	0.9320
linkes Kolon + Rektum	308	52.1 $\pm$ 13.0	53.5	8.8 – 76.0	
<u>TNM-Stadium:</u>					
I+II	217	53.8 $\pm$ 11.9	55.2	8.8 - 76.0	0.0286 (I+II vs III)
III	133	50.2 $\pm$ 14.7	52.0	12.6 - 84.4	0.9716 (III vs IV)
IV	76	50.1 $\pm$ 14.7	52.6	9.4 - 75.8	0.0844 (IV vs I+II)
<u>Histologischer Grad:</u>					
I	11	46.3 $\pm$ 14.3	44.2	20.4 - 68.8	0.1039 (I vs III)
II	349	52.0 $\pm$ 13.3	53.8	8.8 – 84.4	0.1601 (I vs II)
III	70	53.2 $\pm$ 13.6	53.9	9.4 -75.8	0.3906 (III vs II)
<u>Histologischer Typ:</u>					
Adeno Muz)	364	52.5 $\pm$ 13.5	54.1	8.8 - 84.4	0.0413 (Ad. vs Muz)
Muzinöses Si.)	50	49.1 $\pm$ 12.0	51.4	18.2 - 68.4	0.7708 (Muz vs Si.)
Siegelzellring	6	46.4 $\pm$ 16.9	46.2	19.8 - 62.6	0.3184 (Si. vs Ad.)
<u>Resektion:</u>					
R0	404	52.7 $\pm$ 12.9	54.1	8.8 – 84.4	< 0.0001
R1+R2	17	36.7 $\pm$ 15.2	38.9	9,4 – 69.0	

Abkürzungen:

LJ = Lebensjahr, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, MD = Median, Range = Spannweite

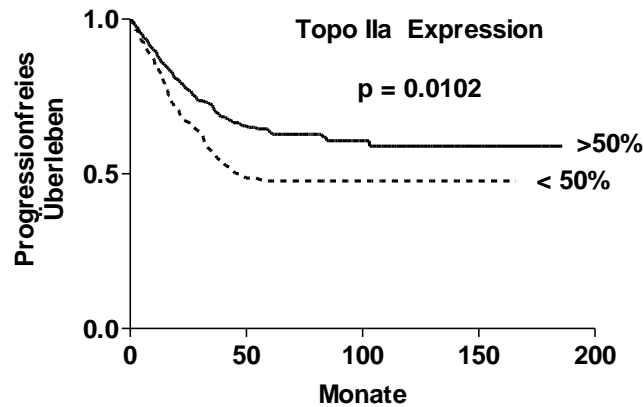
### 3.3.7 Korrelation zum progressionsfreien- und Gesamtüberleben

Bezug nehmend auf dem Median der Expression (53.8%) und dem Mittelwert (52.0%) haben wir die Grenze der positiven Expressionsrate, den sogenannten cut-off Wert, für das progressionsfreie- und Gesamtüberleben bei 50% als Referenzwert für die höhere bzw. niedrige Expression gesetzt. Bei dem Vergleich der unterschiedlichen Expressionsprofilen zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Hinblick auf das Gesamtüberleben. Patienten mit höheren Expressionsraten (>50%) zeigen eine bessere Prognose (medianes Gesamtüberleben nicht erreicht, 5 Jahresüberlebensrate 69.2%). Für die Patienten mit niedriger Expression (<50%) haben wir einen medianes Überleben von 68.4 Monaten mit einer 5 Jahresüberlebensrate von 52.9% ( $p=0.0004$ , Abbildung 16, Tab.7).



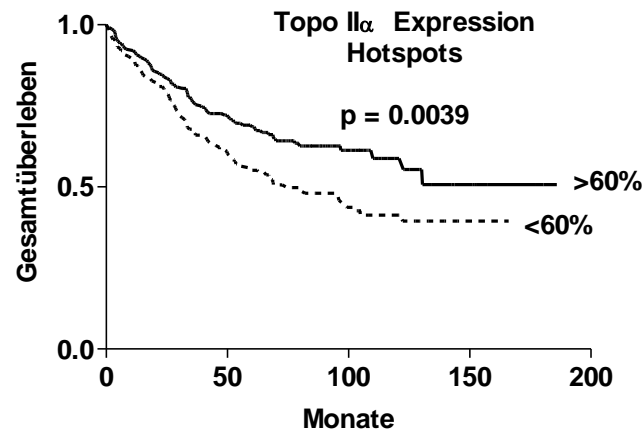
**Abbildung 16:** Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens bei unterschiedlicher Topoisomerase II $\alpha$  Expression.

Beim Betrachten des progressionsfreien Überlebens konnten wir ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen die unterschiedlichen Proliferationsraten finden. Für Patienten mit höheren Expressionsraten zeigte sich ein besserer klinischer Verlauf der Erkrankung mit einem Medianwert des progressionsfreien Überlebens der nicht erreicht wird, im Vergleich hierzu haben Patienten mit niedriger Expressionsrate einen schlechteren Verlauf mit einem Medianwert von 48.4 Monaten ( $p=0.0102$ , Abbildung 17).



**Abbildung 17.** Kaplan-Meier Analyse zur Darstellung der Zusammenhang zwischen progressionsfreien-Überleben bei unterschiedlichen Topo II $\alpha$  Expressionsraten

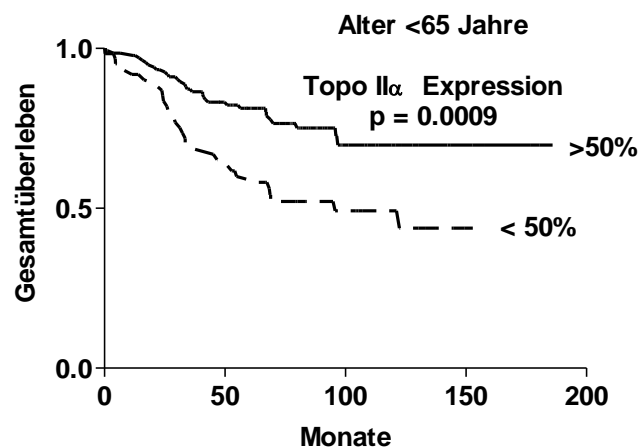
In der Analyse der Daten hinsichtlich der Expressionsrate von Topoisomerase II $\alpha$  auf das Gesamtüberleben ist auch die Beurteilung der Hotspots wichtig. Hier wurde ein cutoff von 60% gewählt. Dabei zeigten sich bei höheren Expressionsraten Raten eine bessere Prognose. Für Expressionsraten > 60% zeigte sich ein Medianwert, der nicht erreicht wird, im Vergleich dazu haben Patienten mit niedrigerer Expressionsraten eine schlechtere Prognose (Medianwert von 74.8 Monaten,  $p=0.0039$ ).



**Abbildung 18:** Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens bei Hotspots der Topo II $\alpha$  Expression.

### 3.3.7.1 Alter

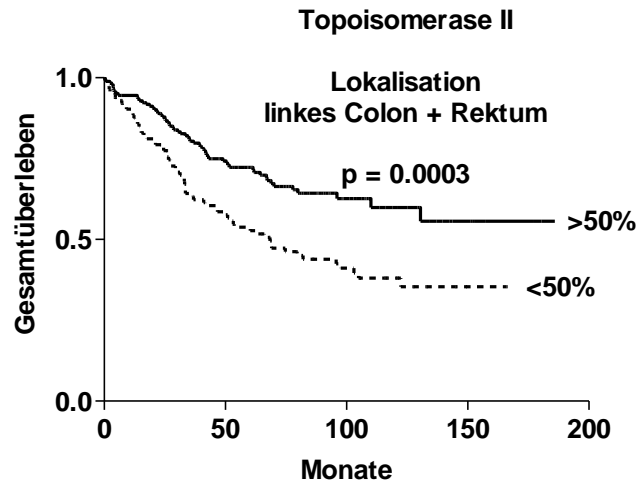
Die Expressionsrate von Topo II $\alpha$  wurde in Abhängigkeit vom Alter hinsichtlich des zum progressionsfreien- und Gesamtüberleben beurteilt. Wir haben einen cut-off von 65 Jahren angesetzt, übereinstimmend des Median (65,2 Jahre) bzw. des Mittelwertes (66 Jahre). Für Patienten über 65 Jahre gab es bei unterschiedlichen Expressionen keinen signifikanten Unterschied auf das gesamte Überleben ( $p=0.1882$ ). Im Gegensatz dazu haben Patienten unter 65 Jahren bei unterschiedlicher Expression eine unterschiedliche Prognose. Patienten, mit hoher Expressionsrate ( $>50\%$  Topo II $\alpha$ ) haben ein längeres medianes Gesamtüberleben (nicht erreicht), im Gegensatz zu Patienten mit niedriger Expressionsrate, die eine deutlich schlechtere Prognose haben (95.7 Monate,  $p=0.0009$ , Abbildung 19).



**Abbildung 19.** Darstellung der prognostischen Unterschiede für Patienten unter 65 Jahren mit unterschiedlichen Expressionsraten.

### 3.3.7.2 Tumorlokalisationen

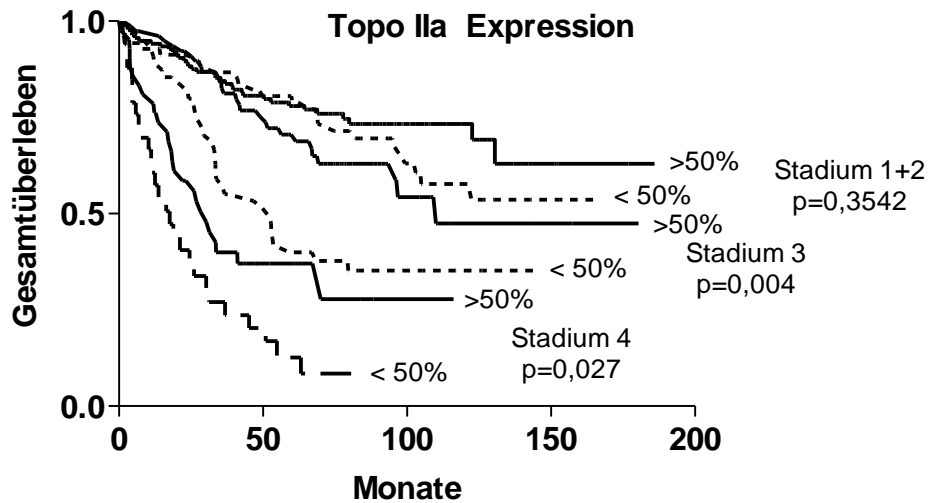
Es wurde die Auswirkung unterschiedlicher Topo II $\alpha$  Expressionsraten auf das progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben bei Patientin mit Kolonkarzinom und Lokalisation im linken Kolon und Rektum untersucht. Patienten deren Tumor eine hohe Expression über 50% hatten, haben ein deutlich längeres medianes Gesamtüberleben (Median nicht erreicht) gegenüber Patienten mit niedriger Topo II $\alpha$  Expressionsrate unter 50% im Tumor (Median 68.4 Monate, Abbildung 20,  $p=0.0003$ ). Beim progressionsfreien Überleben hat die Höhe der Topo II $\alpha$  Expressionsrate keinen Einfluss ( $p=0.7966$ , Tab. 4).



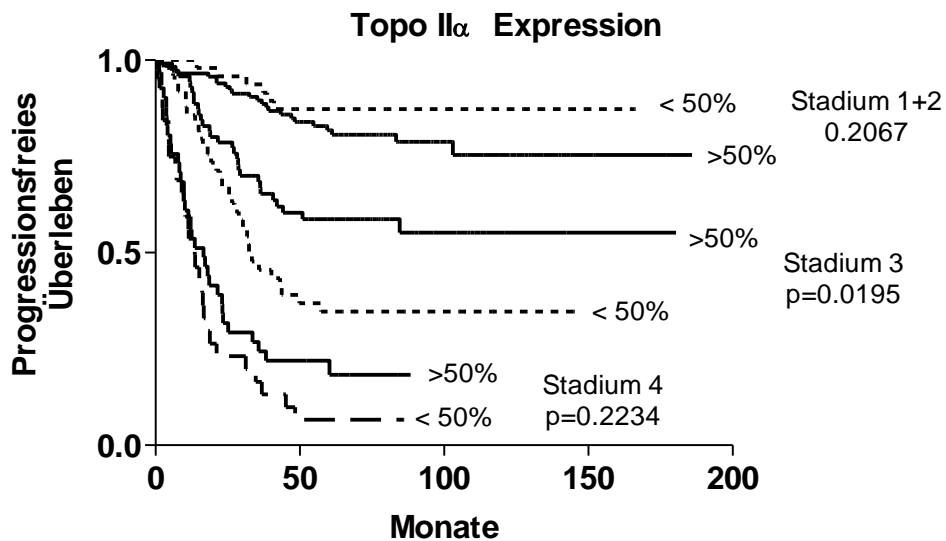
**Abbildung 20.** Unterschiede im Gesamtüberleben für Patienten bei Lokalisation linkes Kolon mit Rektum und unterschiedlichen Expressionsraten von Topo II $\alpha$ .

### 3.3.7.3 Stadien

Wie bei dem gesamten Kollektiv haben wir auch bei der Subanalyse der Stadien in drei Gruppen geteilt. Stadium I+II, Stadium III und Stadium IV. Danach haben wir diese Gruppen bei unterschiedlichen Topo II $\alpha$  Expressionsraten untersucht. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit Karzinomen, die eine höhere ( $\geq 50\%$ ) bzw. niedrige ( $<50\%$ ) Expressionsrate haben im Hinblick auf das Gesamtüberleben innerhalb der einzelnen Stadien III und IV. Innerhalb Stadium III haben die Patienten eine bessere Prognose, wenn sie eine höhere Expressionsrate ( $\geq 50\%$ ) aufwiesen mit einem medianen Gesamtüberleben von 110.1 Monaten gegenüber 51.9 Monate in der Gruppe mit  $<50\%$  Topo II $\alpha$  ( $p=0.004$ , Abb. 21, Tab.4). Patienten mit Stadium IV haben die schlechteste Prognose und innerhalb dieses Stadiums können wir die Prognose anhand des Expressionsprofils noch besser differenzieren. Patienten mit Topo II $\alpha$  Expressionsraten über 50% haben wie beim Stadium III eine bessere Prognose (medianes Gesamtüberleben 30.2 Monate gegenüber 17.6 Monate in der Gruppe mit unter 50% Expression ( $p=0.027$ ). In Gruppe 1 (Stadium I+II) sahen wir einen Trend zwischen den unterschiedlichen Expressionen aber es gab keinen signifikanten Unterschied ( $p=0.3542$ , Tab.4).



**Abbildung 21.** Differenzierung der Stadien und deren Vergleich mit den unterschiedlichen Expressionsraten im Hinblick auf das Gesamtüberleben.

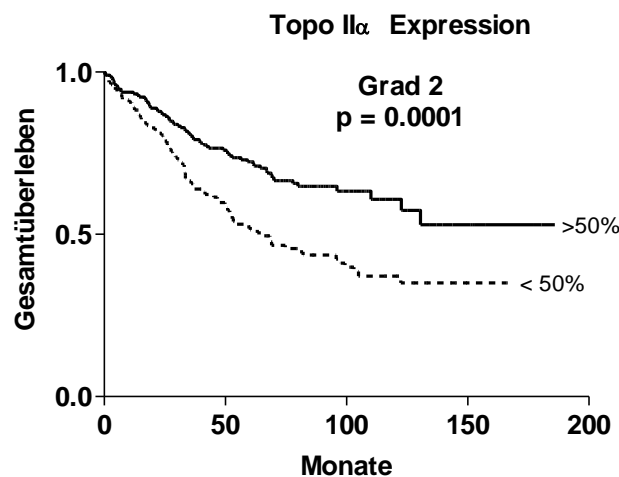


**Abbildung 22.** Differenzierung der Stadien und deren Vergleich mit den unterschiedlichen Expressionsraten im Hinblick auf das progressionsfreie Überleben.



### 3.3.7.4 Histologischer Grad

Es wurde die Auswirkung unterschiedlicher Topo II $\alpha$  Expressionsraten auf das progressionsfreies und Gesamtüberleben bei Patientin mit Kolonkarzinom und unterschiedlichem histologischen Grad untersucht. Bei den Grad I und III Kolonkarzinomen hat die Höhe der Topo II $\alpha$  Expression keinen Einfluss auf das progressionsfreie- und Gesamtüberleben (p jeweils nicht signifikant, Tab.4). In der Gruppe mit histologischen Grad 2 haben Patienten mit Tumoren, die eine hohe Topo II $\alpha$  Expression (>50%) haben, ein signikant höheres medianes Überleben (Median nicht erreicht) als Patienten mit niedriger Expression unter 50% (Median 66.1 Monate, p=0.0001, Abb.23, Tab. 4)

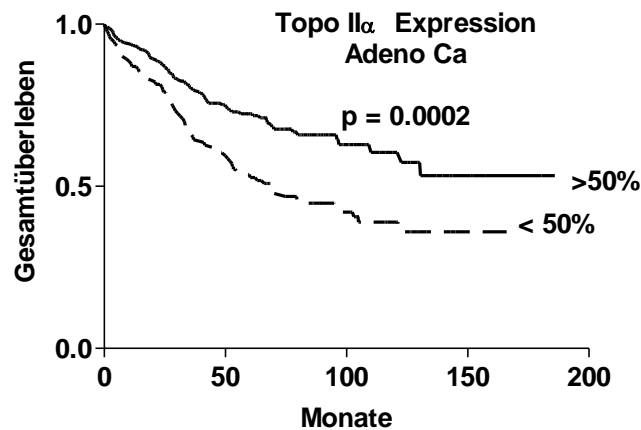


**Abbildung 23.** Unterschiede im Gesamtüberleben bei unterschiedlicher Expressionsraten von Topo II $\alpha$  bei Patienten mit G II Tumoren.

### 3.3.7.5 Histologischer Typ

Aufgrund der niedrigen Fallzahl von den seltenen histologischen Subtypen, dem muzinösen und Siegelzellring Karzinom, konnten wir diese Fälle nicht in unterschiedlichen Expressionsraten separat aufteilen. Diese histologischen Typen wurden in eine Gruppe genommen und die Höhe der Topo II $\alpha$  Expression auf das Progressionsfreie und Gesamtüberleben analysiert. Es konnte kein signifikanter Unterschied sowohl fürs progressionsfreie und für das Gesamtüberleben bei hoher und niedriger Topo II $\alpha$  Expression gezeigt werden (Tab.4). Wir konnten in der Gruppe der Adenokarzinome zeigen, das Patienten mit Tumoren und einer hohen Topo II $\alpha$  Expressionsrate ( $\geq 50\%$ ) eine deutlich bessere Prognose im

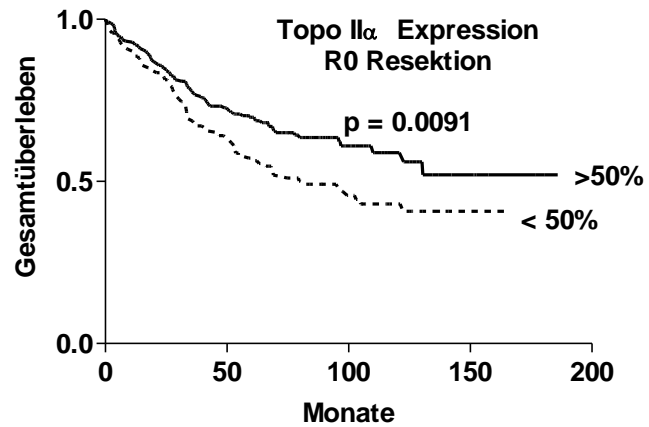
Gesamtüberleben (medianes Gesamtüberleben nicht erreicht) als bei jenen mit niedriger Expressionsrate (medianes Gesamtüberleben von 68.4 Monate,  $p=0.0002$ , Abb. 24). Beim progressionsfreien Überleben zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0.2587$ ).



**Abbildung 24.** Unterschiede im Gesamtüberleben für Patienten mit Adenokarzinom und unterschiedlicher Expressionsraten von Topo II $\alpha$ .

### 3.3.1.2.6 Resektionsstatus

Wir konnten für den Resektionsstatus R0 anhand unterschiedlicher Expression von Topo II $\alpha$  einen weiteren Prognosefaktor finden. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich unterschiedlicher Expressionsraten und des Gesamtüberlebens. Patienten mit R0-Status hatten eine bessere Prognose bei höherer ( $\geq 50\%$ ) Topo II $\alpha$  Expressionsrate. Das mittlere Überleben wurde nicht erreicht im Vergleich zu einer niedrigen Expressionsrate ( $<50\%$ ). Hier lag die mittlere Überlebenszeit bei 82 Monaten, ( $p=0.0091$ , Abb.25). Beim progressionsfreien Überleben fand sich bei hoher oder niedriger Topo II $\alpha$  Expressionsrate kein signifikanter Unterschied. In der Gruppe R1 und R2 konnte kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben gezeigt werden (Tab.4).



**Abbildung 25.** Unterschiede im Gesamtüberleben bei unterschiedlicher Expressionsraten von Topo II $\alpha$  bei Patienten mit R0-Resektion.

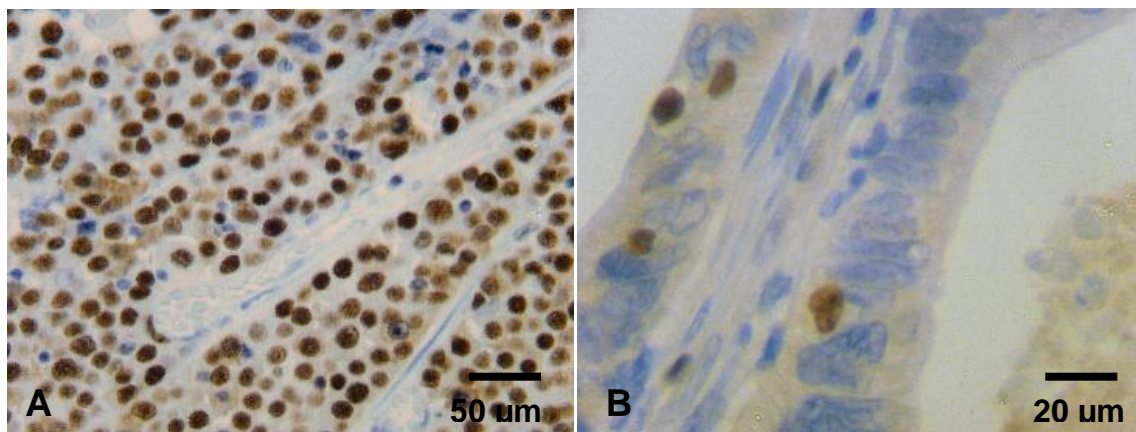
**Tabelle 4.** Kaplan Meier Analyse des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens (PFÜ) bei unterschiedlicher Topo II $\alpha$  Expression und klinisch-pathologischen Subgruppen

Merkmal	Pat. N	OS (Monate)			PFÜ (Monate)		
		>50%	≤50%	P-Wert	>50%	≤50%	P-Wert
<u>Gesamtes Kollektiv:</u>	430	n.e.	68.4	0.0004	n.e.	48.4	0.0102
<u>Alter:</u>							
<65. LJ	211	n.e.	95.7	0.0009	n.e.	n.e.	0.1110
>65. LJ	215	110.1	53.6	0.1882	n.e.	n.e.	0.9594
<u>TNM-Stadium:</u>							
I+II	217	n.e.	n.e.	0.3542	n.e.	n.e.	0.2067
III	133	110.1	51.9	0.004	n.e.	32.4	0.0195
IV	76	30.2	17.6	0.027	16.6	13.6	0.2234
<u>histologischer Grad:</u>							
I	9	n.e.	n.e.	n.a.	n.e.	n.e.	0.4795
II	339	n.e.	66.1	0.0001	n.e.	n.e.	0.2832
III	67	98.6	28.8	0.2071	n.e.	n.e.	0.3865
<u>Histologischer Typ:</u>							
Adeno	364	n.e.	68.4	0.0002	n.e.	n.e.	0.2587
Muzin. + Siegel	56	59.1	53.6	0.8806	n.e.	n.e.	0.9232
<u>Resektion:</u>							
R0	404	n.e.	82.0	0.0091	n.e.	n.e.	0.2991
R1+R2	18	58.0	12.5	0.1675	54.4	47.8	0.6287
<u>Lokalisation:</u>							
rechtes Kolon	115	122.6	58.9	0.3126	n.e.	n.e.	0.1969
linkes Kolon	298	n.e.	68.4	0.0003	n.e.	n.e.	0.7966

Abkürzungen: LJ=Lebensjahr, OS=Gesamtüberleben, PFÜ=progressionsfreies-Überleben, n.e.=nicht erreicht

### 3.4 Immunhistochemische Befunde der Minichromosome Maintenance 6 Expression

Insgesamt konnten wir 570 Präparate mit Minichromosome Maintenance 6 (MCM6) Färbung auswerten. Dabei lag der Median der Expression bei 85.8% und der Mittelwert bei 82.8% (Maximum: 97.0%, Minimum: 27.6%). Basierend darauf haben wir den cut-off bei 85% angesetzt (Abb. 26A und 26B). In 306 der Fälle haben die Patienten hohe Proliferationsrate (Expression  $\geq 85\%$ ). Bei der anderen Patientengruppe, in 264 der Fälle haben sie eine niedrige Expression  $< 85\%$  gehabt.



**Abbildung 26:** Immunhistochemischer Nachweis von MCM6 in kolorektalen Karzinom, dunkelbraun gefärbt sind positive Zellen, **A:** Expressionsrate  $>85\%$  Vergrößerung x200 **B:** Expressionsrate  $< 85\%$ , Vergrößerung x400

#### 3.4.1 Alter

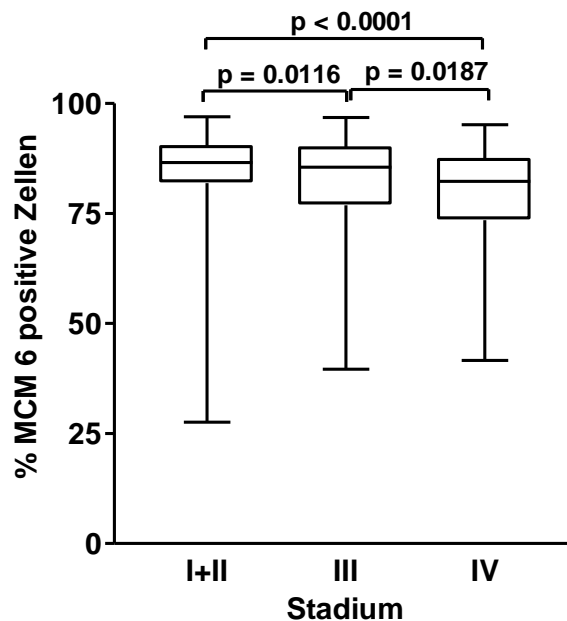
Für das Alter konnten wir keinen signifikanten Unterschied in der MCM6 Expressionsrate finden. Für jüngere Patienten ( $<65$  Jahre) war der Median der Expression bei 86% und für ältere Patienten ( $>65$  Jahre) bei 85.6% mit einem p-Wert von 0.4701 (Tab.5)

#### 3.4.2 Tumorlokalisation

Bei unterschiedlichen Lokalisationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der MCM6 Expressionsrate. Bei dem im rechten Kolon befindlichen Tumoren zeigte sich ein Medianwert der MCM6 Expressionsrate von 84.6% und beim im linken Kolon und Rektum liegenden Tumoren ein Wert von 86.6% mit einem p-Wert von 0.0957.

#### 3.4.3 Stadien

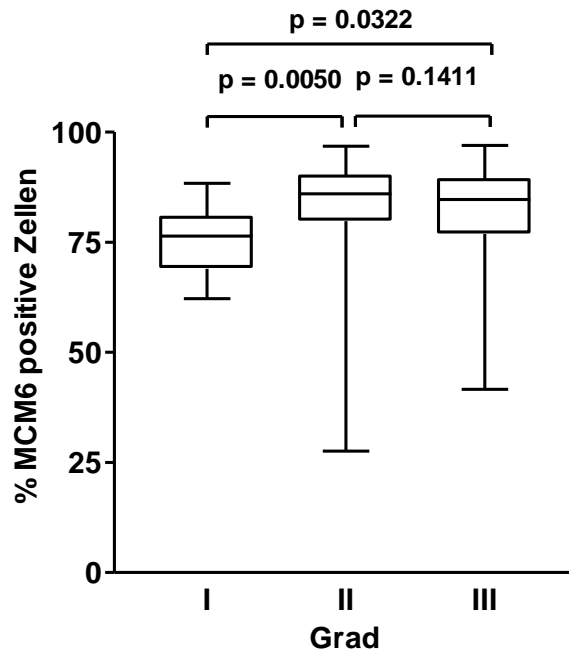
Bei der Analyse der MCM6 Expressionsrate in den unterschiedlichen Stadien zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen den Gruppen. In lokalisierten Stadien (I+II) hatten die Tumore einen Medianwert der Expressionsrate von 86.6%, eine leicht höhere Rate im Vergleich zu den lokal fortgeschrittenen (Stadium III) mit 85.5% ( $p=0.0116$ ). Bei den metastasierten Stadien IV zeigte sich einen Medianwert von 82.3%, im Vergleich zu Stadium III ( $p=0.0187$ ) und Stadium I+II ( $p<0.0001$ ) einen signifikanten Unterschied (Abb. 27).



**Abbildung 27:** Box Plot Analyse der MCM6 Expression in kolorektalen Karzinom in unterschiedlichen Stadien mit Spannweite, Median und oberen und unteren Quartil

#### 3.4.4 Histologischer Grad

In der Analyse der MCM6 Expressionsrate in unterschiedlichen histologischen Graden konnte ein signifikanter Unterschied ( $p=0.0050$ ) zwischen Grad I (Median 76.4%) und Grad II (Median 86%) festgestellt werden (Abb. 28). Im Vergleich zum Grad III mit einem Median von 84.7% fand sich auch zum Grad I ein signifikanter Unterschied, jedoch nicht zum Grad II (Abb. 28).



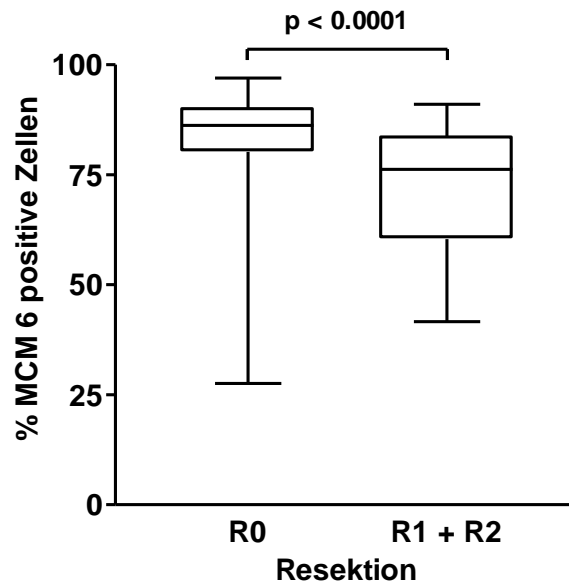
**Abbildung 28:** Box Plot Analyse der MCM6 Expression in kolorektalen Karzinom in unterschiedlichen histologischen Graden mit Spannweite, Median und oberen und unteren Quartil

### 3.4.5 Histologischer Typ.

Beim Vergleich der histologischen Subtypen in Relation zur MCM6 Expressionsrate konnten wir keine signifikante Korrelation finden. Für das Adenokarzinom hatten wir einen Medianwert der Expression von 86%, mit kleinem Unterschied zu dem muzinösen Typ 86.2% ( $p=0.6306$ ). Bei dem Siegelzellring Karzinom zeigte sich die niedrigste Expressionsrate von 82.6%. Es fand sich kein signifikanter Unterschied in Relation zum muzinösen Typ ( $p=0.3055$ ) noch zum Adenokarzinom ( $p=0.3963$ ).

### 3.4.6 Resektionsstatus

Für den Resektionsstatus konnten wir einen hochsignifikanten Unterschied ( $p < 0.0001$ ) bei dem Vergleich der im Resektionsbereich Tumorfreen (R0) und nicht komplett resezierten Tumoren (R1+R2) in Relation zur MCM6 Expressionsrate feststellen. Die R0 resezierte Tumore haben einen Medianwert der MCM6 Expressionsrate von 86.2% im Vergleich zu R1+R2 resezierten mit einem Medianwert von 76.2% (Abb. 29).



**Abbildung 29:** Box Plot Analyse der MCM6 Expression in kolorektalen Karzinom in unterschiedlichen Resektionssituationen mit Spannweite, Median und oberen und unteren Quartil



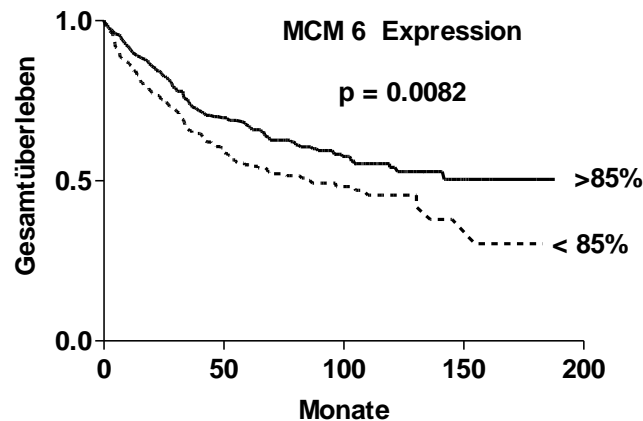
**Tabelle 5.** MCM6 Expressionsrate bei unterschiedlichen klinischen und histologischen Merkmalen

Merkmal	N	% MCM6 Expression				
		MW ± SD	MD	Spannweite	p-Wert	
Alter:						
≤65. LJ	283	83.5 ± 9.1	86.0	47.2 – 96.6	0.4701	
>65. LJ	286	82.2 ± 11.6	85.6	27.6 – 97.0		
Lokalisation:						
rechtes Kolon	164	81.6 ± 11.1	84.6	27.6 – 97.0	0.0957	
linkes Kolon	398	83.2 ± 10.2	86.6	27.8 – 96.8		
TNM-Stadium:						
I+II	274	84.8 ± 9.0	86.6	27.6 – 97.0	0.0116 (I+II vs III)	
III	186	82.1 ± 10.8	85.5	39.6 – 96.8	0.0187 (III vs IV)	
IV	104	78.9 ± 12.1	82.3	41.6 – 95.2	<0.0001 (I+II vs IV)	
Histologischer Grad:						
I	9	78.8 ± 8.3	76.4	62.2 – 88.4	0.0050 (I vs II)	
II	465	83.3 ± 9.9	86.0	27.6 – 96.8	0.1411 (II vs III)	
III	94	80.9 ± 12.5	84.7	41.6 – 97.0	0.0322 (III vs I)	
Histologischer Typ:						
Adeno	493	82.9 ± 10.5	86.0	27.6 – 96.8	0.6306(Ad.	vs
Muz.)						
Muzinös	60	84.4 ± 7.7	86.2	59.0 – 95.0	0.3055	(Muz. vs
Si.)						
Siegelzellring	7	74.2 ± 22.2	82.6	41.6 – 97.0	0.3963 (Ad. vs Si.)	
Resektion:						
R0	526	83.7 ± 9.7	86.2	27.6 – 97.0	< 0.0001	
R1+R2	30	72.5 ± 13.6	76.2	41.6 – 91.0		

Abkürzungen: LJ=Lebensjahr, MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, MD= Median

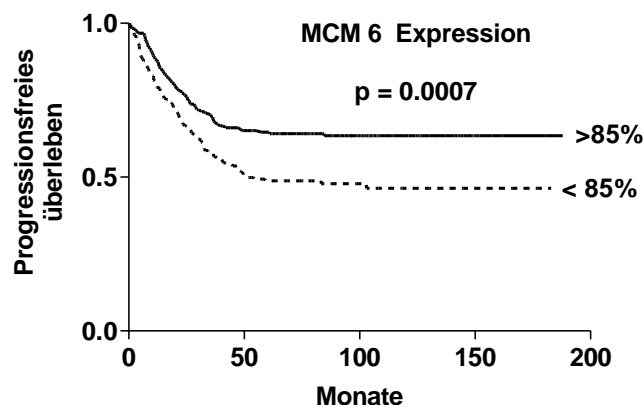
### 3.3.7 Korrelation zum progressionsfreien- und Gesamtüberleben

Verglichen mit den Patienten deren Tumore eine hohe MCM6 Expression mit  $\geq 85\%$  (medianes Gesamtüberleben nicht erreicht) hatten die Patienten mit Tumoren und einer niedrigen Expression von  $< 85\%$  ein schlechteres mittleres Überleben mit 87 Monaten ( $p=0.0082$ , Abb.30).



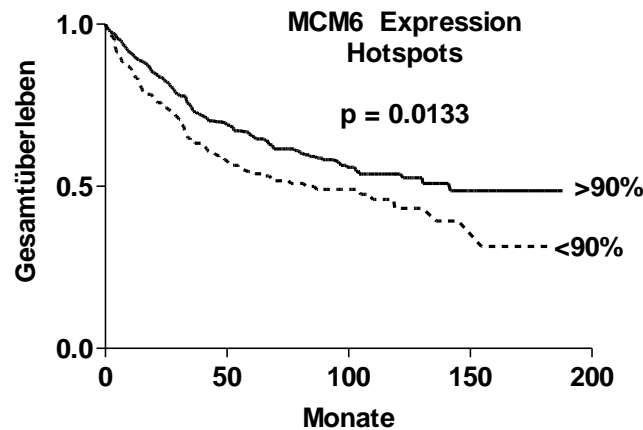
**Abbildung 30:** Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens bei unterschiedlicher MCM6 Expression.

Auch bei der Berechnung des progressionsfreien Überlebens (PFÜ) konnten wir einen signifikanten Unterschied bei unterschiedlich hoher MCM6 Expression finden. Patienten mit Kolonkarzinomen die eine mit höhere Expressionsrate über 85% zeigten einen besseren Verlauf der Erkrankung mit einem Medianwert des PFÜ welcher nicht erreicht wird, gegenüber Patienten mit niedriger Expressionsrate unter 85%, die einen Median von 51 Monate hatten ( $p=0.0007$ , Abb. 31).



**Abbildung 31.** Kaplan-Meier Analyse zur Darstellung des progressionsfreien Überleben bei unterschiedlicher Expressionsrate von MCM6.

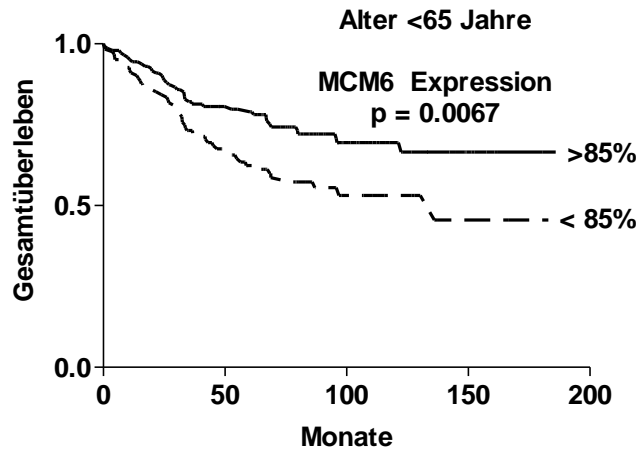
In der Analyse der Hotspots wurde ein Cut-off Wert von 90% gewählt. Es konnte ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben in den unterschiedlichen MCM6 Expressionsgruppen über und unter 90% gezeigt werden (Abb.32).



**Abbildung 32:** Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens bei unterschiedlicher MCM6 Expression und Hotspots.

#### 3.4.7.1 Alter

Für die Patienten mit höherem Alter gab es keinen signifikanten Unterschied beim progressionsfreien und Gesamtüberleben bei unterschiedlichen MCM6 Expressionsraten ( $p=0.4190$  und  $p=0.2460$ ). Wohingegen zeigten Patienten mit einem Alter von  $< 65$  Jahren eine bessere Prognose im Gesamtüberleben bei höheren MCM6 Expressionsraten (medianes Überleben nicht erreicht), im Vergleich zu 136.0 Monaten bei niedriger ( $<85\%$ ) Expression ( $p=0.0067$ , Abb.33, Tab.6).

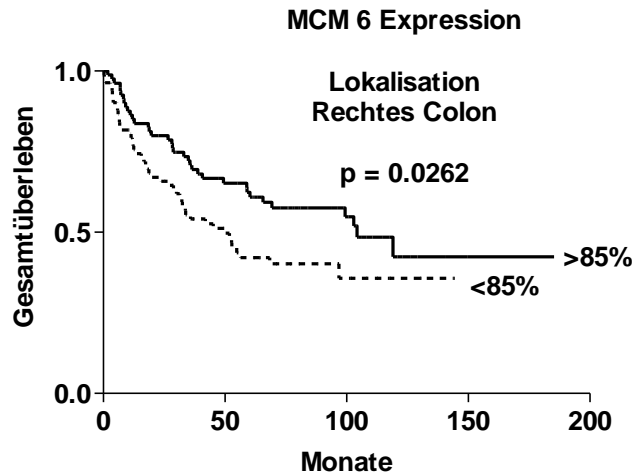


**Abbildung 33:** Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens bei unterschiedlicher MCM6 Expression bei Patienten im Alter unter 65 Jahre.

#### 3.4.7.2 Tumorlokalisation

In der Analyse der MCM6 Expressionsrate in unterschiedlichen Tumorlokalisationen konnte ein signifikanter Unterschied in der Gruppe rechtes Kolon im Gesamtüberleben bei unterschiedlicher MCM6 Expression gezeigt werden ( $p=0.0262$ ). Patienten mit Tumoren, die eine hohe MCM6 Expression ( $>85\%$ ) hatten ein medianes Überleben von 104.3 Monaten im Vergleich zur Gruppe mit niedriger Expression ( $<85\%$ ) mit 49.8 Monaten (Abb.33, Tab. 6). Es fand sich kein Unterschied im Progressionsfreien Überleben ( $p=0.1346$ ).

In der Gruppe linkes Kolon und Rektum konnte keine signifikanter Unterschied sowohl für das progressionsfreie Überleben ( $p=0.6583$ ) als auch fürs Gesamtüberleben ( $p=0.0863$ ) gezeigt werden (Tab. 6).



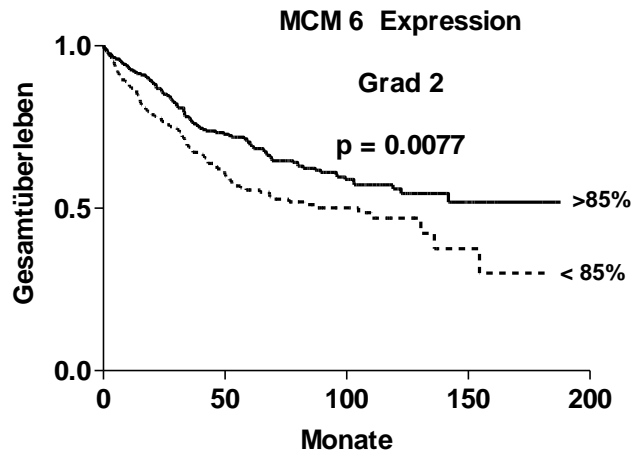
**Abbildung 34:** Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens bei unterschiedlicher MCM6 Expression bei Patienten mit Lokalisation des Tumors im rechten Colon.

#### 3.4.7.3 Stadien

In der Untersuchung unterschiedlicher Stadien gab es keinen signifikanten Unterschied beim progressionsfreien und Gesamtüberleben bei unterschiedlichen MCM6 Expressionsraten (Tab. 6).

#### 3.4.7.4 Histologischer Grad

In der Analyse der MCM6 Expressionsrate bei unterschiedlichen Histologie Graden konnte ein signifikanter Unterschied in der Gruppe Grad II im Gesamtüberleben bei unterschiedlicher MCM6 Expression gezeigt werden ( $p=0.0077$ ). Patienten mit Tumoren, die eine hohe MCM6 Expression (>85%) hatten ein medianes Überleben welches nicht erreicht wurde im Vergleich zur Gruppe mit niedriger Expression (<85%) mit 104.9 Monaten (Abb.35, Tab. 6). Es fand sich kein Unterschied im Progressionsfreien Überleben ( $p=0.1492$ ). Auch in den anderen Histologie-Graden I und III fand sich kein signifikanter Unterschied im progressionsfreien und Gesamtüberleben (Tab.6)

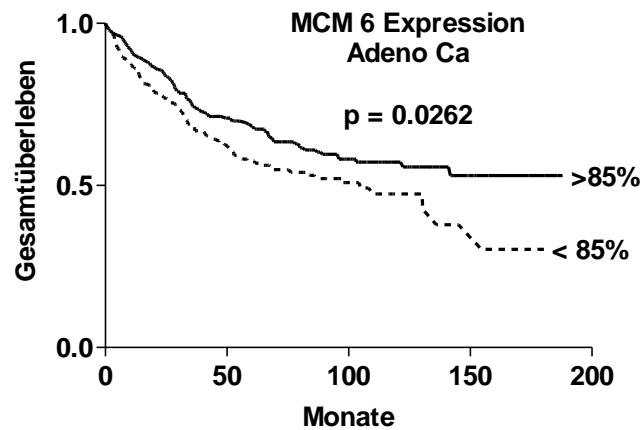


**Abbildung 35:** Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens bei unterschiedlicher MCM6 Expression bei Patienten mit einem Grad II Tumor.

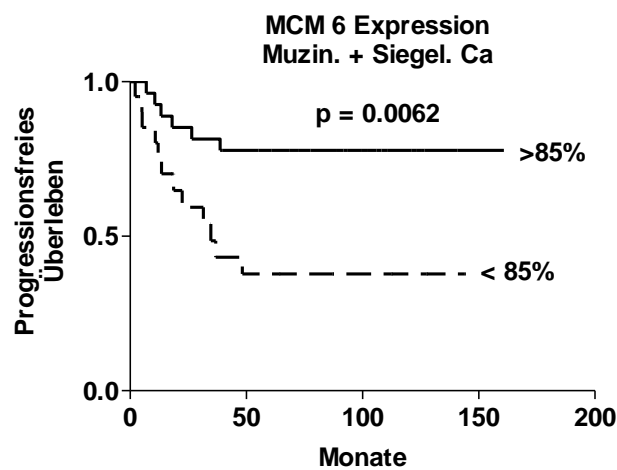
#### 3.4.7.5 Histologischer Typ

In der Analyse der MCM6 Expressionsrate bei unterschiedlichen Histologietypen konnte ein signifikanter Unterschied in der Gruppe Adeno-Karzinom im Gesamtüberleben bei unterschiedlicher MCM6 Expression gezeigt werden ( $p=0.0262$ ). Patienten mit Tumoren, die eine hohe MCM6 Expression (>85%) hatten ein mittleres Überleben welches nicht erreicht wurde im Vergleich zur Gruppe mit niedriger Expression (<85%) mit 104.9 Monaten (Abb.36, Tab. 6). Es fand sich kein Unterschied im progressionsfreien Überleben ( $p=0.8365$ ).

Auch in den anderen Histologie-Subtypen Muzinöses und Siegelringzell Karzinom fand sich ein signifikanter Unterschied im progressionsfreien mit einem Überlebensvorteil für die Gruppe mit hoher MCM6 Expression (Abb. 37). Im Gesamtüberleben konnte kein Unterschied in den unterschiedlichen Expressiongruppen gefunden werden ( $p=0.1029$ , Tab.6).



**Abbildung 36:** Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens bei unterschiedlicher MCM6 Expression bei Patienten mit einem Adenokarzinom.



**Abbildung 37:** Kaplan-Meier Analyse des Gesamtüberlebens bei unterschiedlicher MCM6 Expression bei Patienten mit einem Muzinösen und Siegelring-Karzinom.

#### **3.4.7.6 Resektionsstatus**

In der Analyse der MCM6 Expressionsrate bei unterschiedlichen Resektionssituationen konnte ein signifikanter Unterschied in der Gruppe R1 und R2 Status im progressionsfreien Überleben bei unterschiedlicher MCM6 Expression gezeigt werden ( $p=0.0008$ ). Patienten mit Tumoren, die eine niedrige MCM6 Expression ( $<85\%$ ) hatten ein medianes progressionsfreies Überleben welches nicht erreicht wurde im Vergleich zur Gruppe mit hoher Expression ( $>85\%$ ) mit 9.7 Monaten (Tab. 6). Es fand sich kein Unterschied im Gesamtüberleben sowohl in der Gruppe R1+R2 ( $p=0.3076$ ) als auch in der Gruppe R 0 ( $p=0.1154$ , Tab.6)



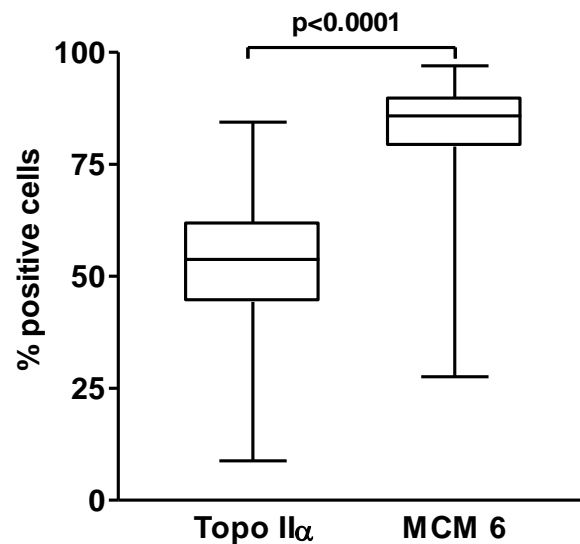
**Tabelle 6.** Kaplan Meier Analyse des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens bei unterschiedlicher MCM6 Expression und klinisch-pathologischen Subgruppen

Merkmal	Pat. N	OS (Monate)			PFÜ (Monate)		
		>85%	≤85%	P-Wert	>85%	≤85%	P-Wert
<u>Gesamtes Kollektiv:</u>	570	n.e. <sup>4</sup>	86.97	0.0082	n.e	51.0	0.0007
<u>Alter:</u>							
<65. LJ	270	n.e.	136.0	0.0067	n.e.	0.4177	
>65. LJ	280	82.0	51.9	0.2460	n.e	n.e	0.4190
<u>TNM-Stadium:</u>							
I+II	262	n.e	154.6	0.7446	n.e	n.e	0.9652
III	184	104.3	84.0	0.4143	n.e	n.e	0.3731
IV	101	26.8	16.4	0.1986	13.6	21.5	0.4230
<u>histologischer Grad:</u>							
I	9	n.e	n.e	n.a.	n.e	n.e	n.a.
II	448	n.e	104.9	0.0077	n.e	n.e	0.1492
III	92	104.3	33.7	0.3934	n.e	n.e	0.8390
<u>Histologischer Typ:</u>							
Adeno	466	n.e	104.9	0.0262	n.e	n.e	0.8365
Muzin. + Siegel.	75	104.3	41.9	0.1029	n.e	34.7	0.0062
<u>Resektion:</u>							
R0	509	n.e	130.5	0.1154	n.e	n.e	0.2440
R1 + R2	29	11.3	15.3	0.3076	9.7	n.e	0.0008
<u>Lokalisation:</u>							
rechtes Kolon	162	104.3	49.8	0.0262	n.e	n.e	0.1346
linkes Kolon	385	n.e	110.1	0.0863	n.e	n.e	0.6583

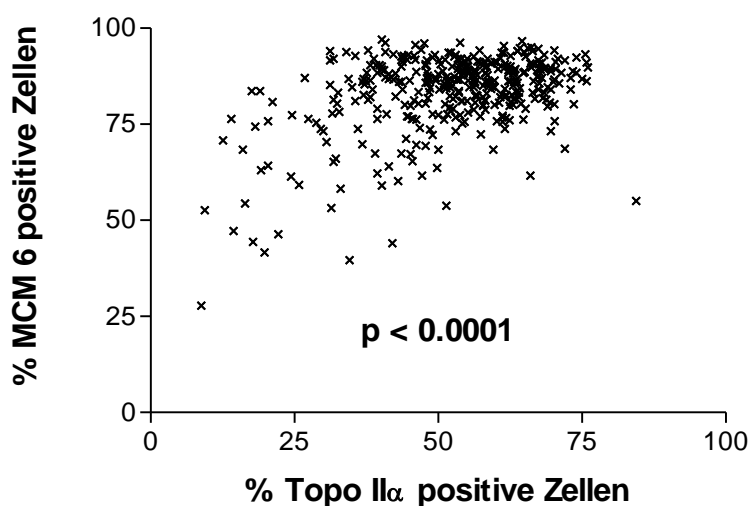
Abkürzungen: LJ=Lebensjahr, OS=Gesamtüberleben, PFÜ=Progressionsfreies-Überleben, n.e.=nicht erreicht

### 3.5 Vergleich der MCM6 und Topo. II $\alpha$ Expression

MCM6 hat insgesamt eine signifikant ( $p < 0.0001$ ) höhere Expressionsrate (Maximum: 97.0%, Mittelwert: 82.8%, Minimum: 27.6%) als die Expressionsrate von Topo II $\alpha$  (Maximum: 84.4%, Mittelwert: 52.0%, Minimum: 8.8%, Abb.38).



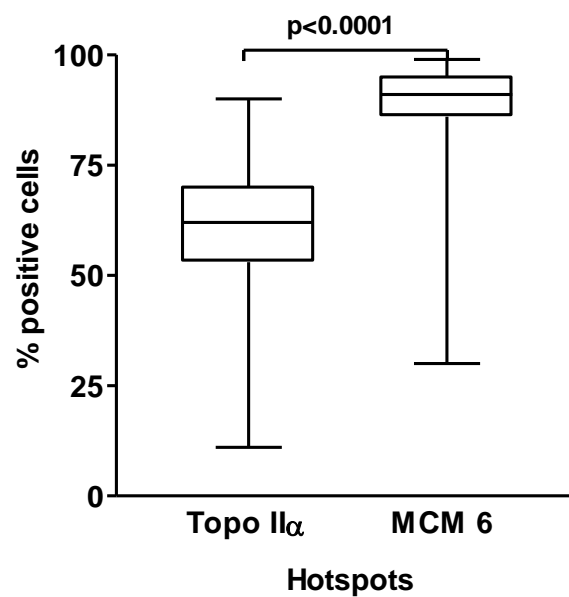
**Abbildung 38.** Box-blot-Analyse der Expressionsraten für beide Marker im Vergleich.



**Abbildung 39:** Korrelationskoeffizient zwischen MCM6 und Topoisomerase II $\alpha$

Wir haben die Korrelation zwischen den beiden Proliferationsmarker untersucht. Mit einem Korrelationskoeffizient von  $r = 0.4329$  sehen wir eine signifikante Korrelation ( $p < 0.0001$ ) bezüglich der Expressionsrate beider Marker (Abb.39)

Auch in der Untersuchung der Hotspots zeigt sich, dass die Expression von Topo II $\alpha$  signifikant ( $p < 0.0001$ ) niedriger ist als die von MCM6 (Abb.40).



**Abbildung 40.** Box-blot-Analyse der Expressionsraten bei Hotspots für beide Marker im Vergleich.

**Tabelle 7.** Kaplan Meier Analyse des Gesamtüberlebens und progressionsfreien Überlebens bei unterschiedlicher Topo IIα und MCM6 Expression

Marker Index	<u>Gesamtüberleben</u>			<u>Progressionsfreies Überleben</u>			
	MD	5-JÜR (Mo)	p-Wert (%)	MD	5-JÜR (Mo)	p-Wert (%)	
<u>TopoIIα</u>							
> 50%		n.e.	69.2	0.0004	n.e.	63.9	0.0102
< 50%		68.4	52.6		48.4	47.7	
<u>TopoIIα Hotspots</u>							
> 60%		n.e.	69.1	0.0039	n.e.	69.8	0.7175
< 60%		74.8	55.1		n.e.	67.2	
<u>MCM6</u>							
> 85%		n.e.	67.6	0.0086	n.e.	64.6	0.0007
< 85%		87.0	55.1		51.0	48.8	
<u>MCM6 Hotspots</u>							
> 90%		141.9	66.1	0.0133	n.e.	72.0	0.2552
< 90%		82.5	54.6		n.e.	65.5	

5-JÜR=5-Jahre-Überlebensrate, MD= Median, Mo=Monate, n.e.=nicht erreicht

#### 4. DISKUSSION

Das Kolorektale Karzinom ist in Deutschland einer der häufigsten Tumorerkrankungen und die zeithäufigste Todesursache bei Tumor bedingten Todesfällen (34). Es konnte gezeigt werden, dass genetische Veränderungen bei verschiedenen Stufen von Kolorektalen Neoplasien eine entscheidende Rolle bei der Progression und Entartung der Tumore spielen (3). Diese Veränderungen beinhalten mutationelle Aktivierung von Oncogene und parallel dazu das Ausfall bzw. Verlust von Tumorsuppressorgene. Zur Abschätzung der Gesamtprognose fehlen neben klinischen Prognosefaktoren andere molekulare Marker. Bei vielen Krebserkrankungen spielt häufig eine Dysregulation der Zellproliferation eine große Rolle. Die Beurteilung der Zellteilung mittels Proliferationsmarkern hat heute eine wichtige Bedeutung in der täglichen Routinediagnostik von bösartigen Erkrankungen gewonnen. Hierbei kommt die immunistochemische Untersuchung mit monoklonalen Antikörpern gegen proliferationsassoziierte Proteine zur Beurteilung der Proliferationsrate zum Einsatz. Ki-67, ein im Institut für Biochemie der Kieler Universität entdecktes Protein, spielt eine wesentliche Rolle (9, 35). Hohe Proliferationsindices von Ki-67 sind häufig mit einem schnellem Tumorwachstum, aggressiven klinischen Verhalten und einer schlechten Prognose von Krebserkrankungen vergesellschaftet, wie es beim Mantelzell-Lymphom beschrieben wurde (36). Aber auch bei anderen soliden Tumorerkrankungen wie dem Mamma Karzinom (18), dem Neuroblastom im Kindesalter (37), dem Lungenkarzinom (38) und dem Prostatakarzinom ist dies beschrieben worden (39). Bei diesen Erkrankungen nimmt die Prognose mit erhöhten Ki-67 Index deutlich ab.

Beim Kolonkarzinom sind die Angaben hinsichtlich prognostischer Bedeutung von hoher und niedriger Tumorproliferation sehr diskrepant. So gibt es Untersuchungen, die zeigen, wie bei den anderen schon oben genannten Krebserkrankungen, dass ein hoher Ki-67 Index mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet ist (40, 41, 42, 43, 44). Im Gegensatz dazu konnten andere Arbeitsgruppen Daten präsentieren, dass ein hoher Ki-67 Index ein Marker für eine gute Prognose ist (45, 46, 47, 48, 49, 50). Eine dritte Gruppe von Wissenschaftlern konnten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich prognostischer Wertigkeit bei hohen oder niedrigen Ki-67 Indices zeigen (51, 52, 53, 54).

Valera und Mitarbeiter fanden in Ihrer Studie, dass ein höherer Proliferationsindex mit fortgeschrittenem Tumorprogression vergesellschaftet war und stellt somit dies als einen Indikator für eine schlechte Prognose bei Patienten mit reseziertem Kolonkarzinom dar (55). In einer kleinen Studie mit 41 Patienten zeigte Petrowsky et al. dass bei Patienten mit einem in die Leber metastasierten Kolonkarzinom und einem hohen Proliferationsindex, mit einem signifikant kürzerem medianen Gesamtüberleben verbunden ist, verglichen mit Patienten mit niedrigem Index (44).

In einer Studie von Fluge und Mitarbeiter an 409 Patienten mit Kolonkarzinom wurde die Proliferationsrate in Abhängigkeit mit der Behandlungsreaktion und Prognose untersucht. Dabei stellten sie fest, dass eine hohe Expression von Ki-67 und EZH2 (Enhancer of zeste homologue 2) eine bessere Prognose und einen günstigeren klinischen Verlauf haben. (50).

In einer weiteren Dissertation von Frau Rona Worth aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Schrader wurde aufgrund dieser Diskrepanz in der Literatur, die Expression von Ki-67 und einem weiteren Proliferationsmarker Repp86 am gleichen Patientenkollektiv untersucht. In den vorläufigen Ergebnissen von bisher knapp 350 untersuchten Patienten konnte bestätigt werden, dass ein hoher Ki-67 Index mit einer guten Prognose vergesellschaftet ist (persönliche Mitteilung PD Dr. C. Schrader).

Bei der Zellteilung spielen viele weitere Proteine eine wichtige Rolle, wie z.B. Topoisomerasen und Minichromosome Maintenance Proteine (MCM). Zu diesen Proteinen gibt es nur sehr wenige Untersuchungen beim Kolonkarzinom mit geringen Fallzahlen ohne klinische Korrelation. Wir haben an einem der größten jemals untersuchten Kollektiven mit Kolorektalen Karzinomen immunhistochemisch sowohl Topoisomerase II alpha als auch Minichromosome Maintenance Proteine 6 untersucht.

Initial wurde eine Analyse der klinischen und histopathologischen Charakteristika mit dem progressionsfreien und dem Gesamtüberleben durchgeführt. Dies diente auch der Beurteilung der Güte des Gesamtkollektivs, ob es mit anderen Kollektiven wie z.B. dem vom Kube und Mitarbeitern (5) vergleichbar ist. Beim Alter zeigte sich, dass jüngere Patienten < 65 Jahre eine bessere Prognose sowohl beim progressionsfreien Überleben ( $p=0.0045$ ) als auch beim Gesamtüberleben ( $p<0.0001$ ) haben. Dies stimmt mit den Daten in der Literatur überein (56) .

Den Dickdarm kann man ab dem letzten Drittel des Kolon transversum, wo der Cannon Böhmsche Punkt lokalisiert ist, in ein linkes Kolon und in ein rechtes Kolon unterteilen (57). Diese Einteilung beruht auf der anatomischen Gegebenheit, dass hier die parasympatische Innervation des N. vagus endet und die des sakralen parasympathischen Innervationsgebietes beginnt. Außerdem ist auch bis zu diesem Punkt das Kolon von der A. mesenterika superior, und ab diesem Punkt wird das linke Kolon von der A. mesenterika inferior mit Blut versorgt. Untersuchungen an großen Kollektiven konnten zeigen, dass Patienten mit Tumoren, die im rechten Kolon lokalisiert sind eine schlechtere Prognose haben, wie im linken Kolon (58, 59). Auch in unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die Patienten, deren Tumore, im Rektum und linken Kolon (Kolon descendenz und Sigma) lokalisiert sind, mit 130.5 Monaten medianen Überleben eine bessere Prognose haben als Patienten deren Tumore im rechten Kolon (Zäkum, Kolon ascendenz und transversum) lokalisiert sind (medianes Überleben 69.5 Monaten,  $p=0.01$ ).

Eine Erklärung dafür konnte sein, dass der Darminhalt im proximalen Teil noch flüssiger ist und eher keine Symptome, wie Blutungen oder Verstopfung verursacht, wohingegen es im distalen Teil schon eingedickt ist und eher klinische Beschwerden verursachen kann.

Bei der Analyse der Stadien haben lokalisierte Stadien I+II die beste Prognose. Dies wird deutlich durch das bessere Gesamtüberleben (mittleres Überleben von 154.6 Monate) im Gegensatz zum Stadium III mit 87 Monaten und 22 Monate im Stadium IV ( $p<0.0001$ ). Auch fürs progressionsfreies Überleben spielen die Stadien einen Einfluss auf die Prognose ( $p<0.0001$ ). Diese Daten stimmen mit der Literatur gut überein. In einer großen Untersuchung von Kube und Mitarbeitern (5) konnten fast identische Verläufe, wie in unserem Kollektiv, an 17684 Patienten gezeigt werden.

Das Grading hat auch einen deutlichen Einfluss auf die Prognose. Bei der Analyse des progressionsfreien Überlebens konnten wir zeigen, dass gut differenzierte Tumore (Grad I und II) die beste Prognose haben (der Medianwert wurde nicht erreicht,  $p=0.0005$ ) im Vergleich zu undifferenzierten Tumoren (Grad III). Dies wird auch in der Literatur von Newland 1981 (60) so beschrieben.

Das Adenokarzinom zeigte im Vergleich zum muzinösen- und zum Siegelzell-Karzinom die beste Prognose mit einer medianen Überlebensrate von 122.6 Monaten. Der zweithäufigste Typ, das muzinöse Karzinom (12%), hat eine schlechtere Prognose mit einem medianen Gesamtüberleben von 68.3 Monaten. Das

Siegelzellring Karzinom, welches am seltensten (0.11%) vorkommt hat eine dramatisch schlechte Prognose mit einem mittleren Gesamtüberleben von nur 12.3 Monaten ( $p=0.0006$ ). Bei der Analyse des progressionsfreien Überleben zeigten sich ähnliche Ergebnisse, dass die Erkrankung beim Siegelzellring Karzinom am schnellsten fortschreitet mit einem medianen Wert von 9.4 Monaten ( $p=0.0096$ ).

Bezüglich des Resektionsstatus haben die Patienten mit R0 Resektion eine eindeutig bessere Prognose mit einem medianen Überleben von 122.6 Monaten. Die andere Gruppe mit mikroskopisch (R1) oder bereits makroskopisch (R2) nicht vollständig entfernten Tumor haben eine dramatisch schlechtere Prognose mit einem medianen Gesamtüberleben von 15.3 Monaten ( $p<0.0001$ ). Diese Daten sind nicht sehr verwunderlich bedenkt man, dass bei R1 und R2 Resektionen Tumorrest im Körper verbleibt und eine palliative Situation vorliegt.

Die Analyse der klinisch-pathologischen Parameter zeigt, dass dieses Kollektiv sehr gut mit den Daten aus der Literatur übereinstimmt und gut geeignet ist für eine Untersuchung mit den Proliferationsmarkern.

Die erste immunhistochemische Untersuchung, die wir durchgeführt haben diente zum Nachweis der Topoisomerase II $\alpha$ , ein Marker für die Zellproliferation, welcher als Enzym für Entdrilling bzw. Schneiden und Wiederverknüpfen von DNA Strängen verantwortlich ist (14, 15). Zur Identifikation der Topoisomerase II $\alpha$  haben wir den Proliferationsmarker Ki-S4 angewandt. Dieser Marker ist ein monoklonaler Antikörper gegen Topoisomerase II $\alpha$  und wurde im Kieler Institut für Hämatopathologie entwickelt. Er erkennt zuverlässig Topoisomerase II $\alpha$  in Paraffin eingebettetem Gewebe (16). Die Expression von Topoisomerase II $\alpha$  konnte beim Mammakarzinom und Morbus Hodgkin als prognostischer Marker nachgewiesen werden (17, 18, 19). Eine hohe Topo II $\alpha$  Expression war bei diesen Erkrankungen mit einem schlechten klinischen Verlauf vergesellschaftet. Auch beim Lungenkarzinom gibt es Untersuchungen zur Topoisomerase Expression II $\alpha$  Expression (61). Dingemans und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine Topo II $\alpha$  Expression über 60% beim kleinzelligen Lungenkarzinom mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (62).

Untersuchungen von Topoisomerasen beim Kolonkarzinom sind sehr wenige nur vorhanden. In einer Untersuchung von Al-Kuraya wurden mittels Fluorescence in Situ hybridisation (FISH) 518 Proben mit Kolonkarzinom untersucht (63). Es wurde nur das Onkogen nachgewiesen. Es erfolgte keine quantitative Messung oder eine



Beurteilung hinsichtlich der Überlebensdaten. Immunhistochemische Untersuchungen von Topoisomerasen sind nur an sehr kleinen Kollektiven wie von Focht et al (64) mit 71 Proben oder Staley (65) mit 29 Fällen erfolgt. In einer größeren Untersuchung von Boonsong wurde Topoisomerase I an 249 Kolonkarzinomproben untersucht. Eine hohe Expression fand sich bei älteren Patienten. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Überleben, Grad, Stadium, oder Geschlecht gezeigt werden (66).

In unsere Untersuchungen, bei dem Vergleich der unterschiedlichen Expressionsprofilen, zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Hinblick des mittleren Gesamtüberlebens. Unser sogenannte cut-off Wert, d.h. der Wert der Expressionrate, nachdem man die Gruppen einteilt, war berechnet worden unter Berücksichtigung des Medianwertes (53.8%) bzw. des Mittelwertes (52.0%) und wurde um einen geraden, glatten Wert zu haben mit 50% festgelegt. Patienten mit höheren Expressionsraten zeigen eine bessere Prognose (medianes Gesamtüberleben nicht erreicht). Für die Patienten mit niedriger Topo II $\alpha$  Expression haben einen Wert von 68.4 Monaten ( $p=0.0004$ ). Auch bei dem Vergleich mit dem progressionsfreien-Überleben konnte wir einen signifikanten Unterschied feststellen ( $p=0.0102$ ). Diese Daten sind im Kontrast zu sehen mit den Daten von Boonsong (66), der keinen Einfluss auf das Überleben zeigte.

Beim Betrachten der Expressionsrate der Topo II $\alpha$  im Vergleich mit dem Alter wird deutlich, dass es eine signifikante Korrelation zwischen den beiden Variablen gibt. Dabei ist die Topo II $\alpha$  Expression bei jüngeren Patienten (<65 Jahre) signifikant höher als bei Älteren (56.2% versus 52%,  $p=0.0044$ ). Diese Daten stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Boonsong, der eine hohe Expression bei den älteren Patienten sah (66). Innerhalb der jüngeren Patienten konnten wir zeigen, dass Patienten mit höherer Topo II $\alpha$  Expressionsrate eine bessere Prognose haben (>50 % Expressionsrate Median Überleben nicht erreicht, < 50%, 95.7 Monaten,  $p=0.0009$ ). Bei älteren Patienten konnten wir keinen Unterschied finden.

Bei den Subgruppen der Lokalisation der Tumore in Assoziation zur Expressionsrate konnten wir keinen signifikanten Unterschied finden. Für das rechte Kolon zeigte sich ein Median der Topo II $\alpha$  Expressionsrate von 54.2% und für das linke Kolon 53.5% ( $p=0.932$ ). Dies Ergebnis ist verwunderlich, da die im linken Kolon lokalisierten Karzinome eine bessere Prognose haben als die im rechten Kolon

lokalisierten und man somit auch einen Unterschied in der Proliferation vermuten würde.

Bei den unterschiedlichen Stadien zeigt sich nur ein signifikanter Unterschied zwischen den lokalisierten Stadien I+II im Vergleich zu dem lokal fortgeschrittenen Stadium III (Median der Expressionsrate 55.2% gegenüber 52%,  $p=0.0286$ ). Diese Daten stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Boonsong, der keinen Unterschied in der Expression von Topoisomerase und unterschiedlichen Stadien sah (66). Beim Vergleich des Stadiums III mit IV zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0.9716$ ). Innerhalb der jeweiligen Stadien stellten wir fest, dass es signifikante Unterschiede im Hinblick auf das mediane Gesamtüberleben zwischen den höheren ( $\geq 50\%$ ) bzw. niedrigen ( $<50\%$ ) Topo II $\alpha$  Expressionsraten gibt. Auch innerhalb des Stadium III haben die Patienten eine bessere Prognose, wenn sie höhere Expressionsraten aufwiesen (medianes Gesamtüberleben 110.1 Monate gegenüber 51.9 Monate,  $p=0.004$ ). Stadium IV hat die schlechteste Prognose und auch hier diskriminiert die Topo II $\alpha$  Expression zusätzlich. Patienten mit höheren Expressionsraten haben wie im Stadium III eine bessere Prognose (30.2 Monate gegenüber 17.6 Monate,  $p=0.027$ ). Besonders diese Analyse zeigt die hohe Wertigkeit und prognostische Aussagekraft des Proliferationsmarker Topo II $\alpha$ . Es können in den einzelnen Stadium Patienten identifiziert werden, die eine bessere Prognose haben. So ist die Prognose von Patientin mit Stadium IV, d.h. im metastasiertem Stadium mit hoher ( $\geq 50\%$ ) Topo II $\alpha$  Expression mit einem medianen Überleben fast gleichzusetzen den Patientin im Stadium III (d.h. ohne Fernmetastase, aber Lymphknotenbefall) und niedriger Topo II $\alpha$  unter 50%. Es findet sich zwischen diesen beiden Subgruppen kein signifikanter Unterschied mehr ( $p=0.1242$ ).

Eine Erklärung könnte sein, dass es bei höheren Topo II $\alpha$  Expressionsraten die Tumoren schneller klinisch sich bemerkbar machen, wie zum Beispiel mit einem Darmverschluss (Ileus). Klinische Daten zu den initialen Beschwerden der Patienten lagen uns leider nicht vor.

Beim Vergleich der Topo II $\alpha$  Expressionsrate bei den unterschiedlichen histologischen Typen zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p=0.0413$ ) zwischen dem Adenokarzinom (54.1%) und dem muzinösen Karzinom (51.4%). Innerhalb der Gruppe der Adenokarzinome, konnten wir bei Patienten mit Tumoren und höheren Expressionsraten zeigen, dass diese eine deutlich bessere Prognose haben ( $p=0.0002$ ). Hierzu gibt es keine Daten in der Literatur.

Bei der zweiten immunhistochemischen Färbung haben wir das Minichromosome Maintenance 6 (MCM6) Protein untersucht. Minichromosome Maintenance Proteine sind Komponenten des präreplikativen Komplexes, das für die Initiation der Replikation eine wichtige Rolle spielt (67, 68, 69, 70, 71). Sie sind notwendig für die Aktivität der DNA-Polymerase und sind somit ein Marker der Zellproliferation (72) (20, 21, 73). Wir haben den aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Parwaresch (ehemaliger Direktor des Instituts für Hämatopathologie Kiel) entwickelten spezifischen Antikörper gegen MCM6, den Ki-MCM6, angewandt (22). Dieser Antikörper ist in der Lage, das MCM6 Protein in Paraffin eingebettetem Gewebe nachzuweisen (22, 23). Es konnte gezeigt werden, daß MCM6 während der Zellzyklus Phasen G1, S, G2 und M an das nukleäre Chromatin bindet und wird während der Zellzyklus-Phasen G1-, S-, G2- und M-Phase exprimiert (22, 32).

Die klinische Bedeutung von MCM Proteinen als Proliferationsmarker wurde in einigen Studien an unterschiedlichen malignen Tumoren nachgewiesen (24)), wie z.B. dem Prostatakarzinom (74), Mammakarzinom (75), Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (76), Chondrosarkom (23), Schilddrüsenkarzinom (77) und dem Nierenzellkarzinom (78). Die meisten Studien über MCM Proteine haben dem Subtyp MCM2 untersucht (24, 25, 26, 27, 28). In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass die Prognose der Erkrankung von der Höhe der MCM Expression abhängt. Je höher die Expression, desto schlechter die Prognose der Erkrankung. Nur wenige Studien haben sich mit MCM6 beschäftigt (23, 32). Untersuchungen über MCM6 am Kolorektalen Karzinom gibt es nicht.

Es wurden Untersuchungen von MCM3 Genen an 7 Proben von Kolonkarzinomen durchgeführt. Es erfolgte aufgrund der geringen Fallzahl keine Korrelation mit klinischen Daten (79). Nishihara und Mitarbeiter untersuchten Ki-67, Geminin und MCM7 an 191 Tumorproben von Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium Dukes B und C. Eine hohe Expression von diesen Proliferationsmarkern war mit einer schlechten Prognose assoziiert (80).

Die MCM6 Expressionsrate war mit einem Mittelwert von 83% erwartungsgemäß signifikant höher, als die von Topo II $\alpha$  mit 52% ( $p < 0.0001$ , Abb.38). Dies war deshalb zu erwarten, da MCM6 auch die frühe G1 Phase mit erfasst und somit sich mehr teilende Zellen anfärben. Man findet MCM6 während der gesamten G1-Phase, was

nicht der Fall bei anderen Zellproliferationsmarker wie Ki-67 oder Topo II $\alpha$  ist. Hierdurch kann auch der Teil der Zellen, die in der frühen G1-Phase sind, mit MCM6 nachgewiesen werden (22). Ähnliche Ergebnisse konnte die Arbeitsgruppe von Dr. Schrader auch beim Mantelzell-Lymphom zeigen (11). Es fand in dieser Untersuchung auch eine gute Korrelation der beiden Marker, d.h. Kolonkarzinome mit niedriger Topo II $\alpha$  Expression hatten auch eine niedrige MCM6 Expression und umgekehrt ( $r=0.4329$ ;  $p<0.0001$ , Abb.39).

Analog zu den Untersuchungen von Topo II $\alpha$  haben wir bei MCM6 die Expression bei unterschiedlichen klinischen Parametern untersucht. Hier zeigte sich, dass es, im Gegensatz zu Topo II $\alpha$ , je fortgeschrittener das Stadium ist, desto geringer ist die MCM6 Expression. Im Stadium I und II ist sie höher, als im Stadium III und im Stadium IV am niedrigsten (Abb. 27). Dieses Ergebnis war an sich nicht zu erwarten, da man in fortgeschrittenen Stadium (IV) von einem schnellen Wachstum und damit hoher Proliferation ausgeht wie es Giaginis bei MCM2 festgestellt hat (30).

In der Analyse der MCM6 Expression in Abhängigkeit vom Resektionsrand konnte gezeigt werden, dass Patienten mit nicht vollständiger Entfernung des Tumors im Gesunden, sogenannte R1 und R2 Resektionen, einen deutlich niedrigeren MCM6 Index ( $p<0.0001$ ) haben, als Patienten mit kompletter Entfernung des Tumors, einer sogenannten R0-Resektion (Abb.29). Auch dies ist erstaunlich, da man annehmen würde, dass bei fehlender operativer Möglichkeit einer kompletten Tumorentfernung (R1 und R2 Resektionen) die Tumore aggressiver und damit auch schneller wachsen würden.

In der Analyse der MCM6 Expression bezüglich des progressionsfreien und Gesamtüberleben konnten wir zeigen, dass eine hohe Expression über 85% jeweils mit einer besseren Prognose vergesellschaftet ist (Abb. 30 und 31). Diese Daten zeigen den gleichen Trend wie die Daten aus der Topo II $\alpha$  Expression. Dieser Übervorteil lässt sich erstaunlicherweise auch in den Subgruppen Alter unter 65 Jahre, Tumorlokalisation rechtes Colon und histologischen Grad II sowie dem Adenokarzinomsubtyp nachweisen. Das bedeutet, dass innerhalb von guten Prognosegruppen können zusätzliche prognostische Informationen durch die MCM6 Expression gewonnen werden.

In dieser Dissertation konnte an einem sehr großen Kollektiv von Patienten mit Kolonkarzinom gezeigt werden, dass sowohl die Proliferationsmarker Topo II $\alpha$  als

auch MCM6 prognostische Faktoren bezüglich des progressionsfreien als auch des Gesamtüberlebens sind. Im Gegensatz zu dem, was erwartet wurde, ist nicht eine niedrige, sondern eine hohe Expression und somit Proliferation mit einer günstigen Prognose assoziiert. Dies bedeutet, dass schlecht differenzierte Tumore eher für das Fortschreiten des Tumors und zur Bildung der Metastasierung zuständig sind, und nicht wie bis jetzt gedacht wurde, dass eine hohe Zellteilung/ Proliferation für die Bildung der Metastasierung verantwortlich ist. Aufgrund dieser Ergebnisse sollte eine hohe Proliferation nicht automatisch mit einer schlechten Differenzierung des Tumor gleichgesetzt werden. Die Bestimmung der Proliferation kann zur Prognoseeinschätzung bei Patienten mit Kolorektalen Karzinom dienen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Kolorektale Karzinom ist einer der häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland. Die Inzidenzrate und Mortalität steigen stetig an. Neben klinischen Prognosefaktoren gibt es wenige anerkannte Risikofaktoren. Die Zellteilung und Proliferation spielt bei vielen Tumoren eine zentrale Rolle. Die Bedeutung der Expression von proliferationsassoziierten Proteinen im Kolorektalen Karzinom wird in unterschiedlichen Studien sehr kontrovers diskutiert.

Ziel dieser Untersuchung war es die Expression der Proliferationsmarker Topoisomerase (Topo) II  $\alpha$  und Minichromosome Maintenance 6 (MCM6) bei Patienten mit Kolorektalen Karzinom zu untersuchen. Die Ergebnisse sollten dann mit den klinisch-pathologischen Befunden korreliert werden. Insbesondere sollte überprüft werden, ob eine unterschiedlich hohe Expression von Topo II  $\alpha$  und MCM6 mit einem unterschiedlichen progressionsfreien und Gesamtüberleben assoziiert ist.

Formalinfixiertes in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe von 619 Patienten wurde immunhistochemisch mit den Antikörper Ki-S4 gegen Topoisomerase II  $\alpha$  und Ki-MCM6 gegen MCM6 untersucht. 500 Tumorzellen wurden ausgezählt, wobei auch Areale mit hoher Proliferation berücksichtigt wurden. Es wurde ein prozentualer Mittelwert bestimmt und mit den klinischen Daten korreliert.

MCM6 hat insgesamt eine signifikant ( $p < 0.0001$ ) höhere Expressionsrate (Maximum: 97.0%, Mittelwert: 82.8%, Minimum: 27.6%) als die Expressionsrate von Topo II $\alpha$  (Maximum: 84.4%, Mittelwert: 52.0%, Minimum: 8.8%). Beide Marker zeigten eine gute Korrelation ( $p < 0.0001$ ). Patienten mit höheren Topo II $\alpha$  Expressionsraten ( $>50\%$ ) zeigen eine bessere Prognose (medianes Gesamtüberleben nicht erreicht, 5 Jahresüberlebensrate 69.2%) als Patienten mit niedriger Expression ( $<50\%$ ) (medianes Überleben von 68.4 Monaten, 5 Jahresüberlebensrate von 52.9%,  $p = 0.0004$ ). Einen gleichen Trend ergab auch die Untersuchung für progressionsfreies Überleben. In der Untersuchung von MCM6 ergab, dass Tumore die eine hohe MCM6 Expression mit  $\geq 85\%$  hatten, das mediane Gesamtüberleben nicht erreichten (5 Jahresüberlebensrate von 67.6%). Im Gegensatz dazu hatten die Patienten mit Tumoren und einer niedrigen Expression von  $<85\%$  ein deutlich schlechteres mittleres Überleben mit 87 Monaten (5 Jahresüberlebensrate von 55.1%,  $p = 0.0082$ ). Auch beim progressionsfreien Überleben hatten Patienten mit Tumoren und hoher MCM6 Expression einen besseren Verlauf ( $p = 0.0007$ ).

In dieser Untersuchung konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine hohe Expression von Topo II  $\alpha$  und MCM6 sowohl mit einem signifikant besseren progressionsfreien Überleben als auch mit einem besseren Gesamtüberleben verbunden ist. Diese Ergebnisse konnten sowohl für das gesamte Kollektiv, als auch bei unterschiedlichen Subgruppen, wie z.B. Stadien gezeigt werden. Somit ist eine hohe Tumorzellproliferation nicht, wie bisher angenommen, ein schlechter, sondern ein guter Prognosefaktor.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Schmiegel W, Pox C, Reinacher-Schick A, Adler G, Arnold D, Fleig W, Folsch UR, Fruhmorgen P, Graeven U, Heinemann V, Hohenberger W, Holstege A, Junginger T, Kopp I, Kuhlbacher T, Porschen R, Propping P, Riemann JF, Rodel C, Sauer R, Sauerbruch T, Schmitt W, Schmoll HJ, Seufferlein T, Zeitz M et al. S3 guidelines for colorectal carcinoma: results of an evidence-based consensus conference on February 6/7, 2004 and June 8/9, 2007 (for the topics IV, VI and VII). *Z Gastroenterol* 2010;48(1):65-136.
- (2) Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, Graeven U, Heinemann V, Porschen R, Riemann J, Rodel C, Sauer R, Wieser M, Schmitt W, Schmoll HJ, Seufferlein T, Kopp I, Pox C. [Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008]. *Z Gastroenterol* 2008;46(8):799-840.
- (3) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319(9):525-32.
- (4) Kirkegaard H, Johnsen NF, Christensen J, Frederiksen K, Overvad K, Tjonneland A. Association of adherence to lifestyle recommendations and risk of colorectal cancer: a prospective Danish cohort study. *BMJ* 2010;341: c5504.
- (5) Kube R, Gastinger I, Mroczkowski P, Ptok H, Wolff S, Lippert H. The care of patients with colon cancer: current treatment, and evaluation of new surgical approaches. *Dtsch Arztebl Int* 2011;108(4):41-6.
- (6) Ruschoff J, Heinmoller E, Hartmann A, Buttner R, Rau T. [Differential diagnostics of hereditary colorectal cancer syndromes. The role of pathology]. *Pathologe* 2010;31(6):412-22.
- (7) Douillard JY. Microsatellite instability and mismatch repair genes in colorectal cancer: useful tools for managing patients and counseling their relatives. *Clin Colorectal Cancer* 2010;9(4):193-4.



- (8) Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000;342(2):69-77.
- (9) Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133(4):1710-5.
- (10) Schrader C, Meusers P, Brittinger G, Teymoortash A, Siebmann JU, Janssen D, Parwaresch R, Tiemann M. Topoisomerase IIalpha expression in mantle cell lymphoma: a marker of cell proliferation and a prognostic factor for clinical outcome. *Leukemia* 2004;18(7):1200-6.
- (11) Schrader C, Janssen D, Klapper W, Siebmann JU, Meusers P, Brittinger G, Kneba M, Tiemann M, Parwaresch R. Minichromosome maintenance protein 6, a proliferation marker superior to Ki-67 and independent predictor of survival in patients with mantle cell lymphoma. *Br J Cancer* 2005;93(8):939-45.
- (12) Kellner U, Rudolph P, Parwaresch R. Human DNA-Topoisomerases - Diagnostic and Therapeutic Implications for Cancer. *Onkologie* 2000 ;23 (5 ):424 .
- (13) Kellner U, Sehested M, Jensen PB, Gieseler F, Rudolph P. Culprit and victim DNA topoisomerase II. *Lancet Oncol* 2002 Apr ;3 (4 ):235 -433.
- (14) DiNardo S, Voelkel K, Sternglanz R. DNA topoisomerase II mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(9):2616-20.
- (15) Charron M, Hancock R. DNA topoisomerase II is required for formation of mitotic chromosomes in Chinese hamster ovary cells: studies using the inhibitor 4'-demethylepipodophyllotoxin 9-(4,6-O-thenylidene-beta-D-glucopyranoside). *Biochemistry* 1990;29(41):9531-7.
- (16) Kellner U, Heidebrecht HJ, Rudolph P, Biersack H, Buck F, Dakowski T, Wacker HH, Domanowski M, Seidel A, Westergaard O, Parwaresch R.

Detection of human topoisomerase II alpha in cell lines and tissues: characterization of five novel monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 1997;45(2):251-63.

- (17) Rudolph P, Olsson H, Bonatz G, Ratjen V, Bolte H, Baldetorp B, Ferno M, Parwaresch R, Alm P. Correlation between p53, c-erbB-2, and topoisomerase II alpha expression, DNA ploidy, hormonal receptor status and proliferation in 356 node-negative breast carcinomas: prognostic implications. *J Pathol* 1999;187(2):207-16.
- (18) Rudolph P, MacGrogan G, Bonichon F, Frahm SO, de MI, Trojani M, Durand M, Avril A, Coindre JM, Parwaresch R. Prognostic significance of Ki-67 and topoisomerase IIalpha expression in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A multivariate analysis of 863 cases. *Breast Cancer Res Treat* 1999;55(1):61-71.
- (19) Provencio M, Corbacho C, Salas C, Millan I, Espana P, Bonilla F, Ramon CS. The Topoisomerase IIalpha Expression Correlates with Survival in Patients with Advanced Hodgkin's Lymphoma. *Clin Cancer Res* 2003;9(4):1406-11.
- (20) Ogawa Y, Takahashi T, Masukata H. Association of fission yeast Orp1 and Mcm6 proteins with chromosomal replication origins. *Mol Cell Biol* 1999;19(10):7228-36.
- (21) Fujita M, Kiyono T, Hayashi Y, Ishibashi M. In vivo interaction of human MCM heterohexameric complexes with chromatin. Possible involvement of ATP. *J Biol Chem* 1997;272(16):10928-35.
- (22) Heidebrecht HJ, Buck F, Endl E, Kruse ML, Adam-Klages S, Andersen K, Frahm SO, Schulte C, Wacker HH, Parwaresch R. Ki-Mcm6, a new monoclonal antibody specific to Mcm6: comparison of the distribution profile of Mcm6 and the Ki-67 antigen. *Lab Invest* 2001 ;81 (8 ):1163 -581.
- (23) Helfenstein A, Frahm SO, Krams M, Drescher W, Parwaresch R, Hassenpflug J. Minichromosome maintenance protein (MCM6) in low-grade

chondrosarcoma: distinction from enchondroma and identification of progressive tumors. *Am J Clin Pathol* 2004;122(6):912-8.

- (24) Freeman A, Morris LS, Mills AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH, Coleman N. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res* 1999 ;5(8):2121-32.
- (25) Chatrath P, Scott IS, Morris LS, Davies RJ, Rushbrook SM, Bird K, Vowler SL, Grant JW, Saeed IT, Howard D, Laskey RA, Coleman N. Aberrant expression of minichromosome maintenance protein-2 and Ki67 in laryngeal squamous epithelial lesions. *Br J Cancer* 2003;89(6):1048-54.
- (26) Davidson EJ, Morris LS, Scott IS, Rushbrook SM, Bird K, Laskey RA, Wilson GE, Kitchener HC, Coleman N, Stern PL. Minichromosome maintenance (Mcm) proteins, cyclin B1 and D1, phosphohistone H3 and in situ DNA replication for functional analysis of vulval intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 2003;88(2):257-62.
- (27) Scott IS, Heath TM, Morris LS, Rushbrook SM, Bird K, Vowler SL, Arends MJ, Coleman N. A novel immunohistochemical method for estimating cell cycle phase distribution in ovarian serous neoplasms: implications for the histopathological assessment of paraffin-embedded specimens. *Br J Cancer* 2004 I; 19;90(8):1583-90.
- (28) Kodani I, Osaki M, Shomori K, Araki K, Goto E, Ryoke K, Ito H. Minichromosome maintenance 2 expression is correlated with mode of invasion and prognosis in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2003;32(8):468-74.
- (29) Hanna-Morris A, Badvie S, Cohen P, McCullough T, Andreyev HJ, Ien-Mersh TG. Minichromosome maintenance protein 2 (MCM2) is a stronger discriminator of increased proliferation in mucosa adjacent to colorectal cancer than Ki-67. *J Clin Pathol* 2009 ;62(4):325-30.
- (30) Giaginis C, Georgiadou M, Dimakopoulou K, Tsourouflis G, Gatzidou E, Kouraklis G, Theocharis S. Clinical significance of MCM-2 and MCM-5

expression in colon cancer: association with clinicopathological parameters and tumor proliferative capacity. *Dig Dis Sci* 2009;54(2):282-91.

- (31) Scott IS, Morris LS, Bird K, Davies RJ, Vowler SL, Rushbrook SM, Marshall AE, Laskey RA, Miller R, Arends MJ, Coleman N. A novel immunohistochemical method to estimate cell-cycle phase distribution in archival tissue: implications for the prediction of outcome in colorectal cancer. *J Pathol* 2003;201(2):187-97.
- (32) Labib K, Kearsey SE, Diffley JF. MCM2-7 proteins are essential components of prereplicative complexes that accumulate cooperatively in the nucleus during G1-phase and are required to establish, but not maintain, the S-phase checkpoint. *Mol Biol Cell* 2001;12(11):3658-67.
- (33) Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992;168(4):357-63.
- (34) Brenner H, Bouvier AM, Foschi R, Hackl M, Larsen IK, Lemmens V, Mangone L, Francisci S. Progress in colorectal cancer survival in Europe from the late 1980s to the early 21st century: The EURO CARE study. *Int J Cancer* 2011 23;10.
- (35) Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983 15;31(1):13-20.
- (36) Byrd JC, Rai K, Peterson BL, Appelbaum FR, Morrison VA, Kolitz JE, Shepherd L, Hines JD, Schiffer CA, Larson RA. Addition of rituximab to fludarabine may prolong progression-free survival and overall survival in patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: an updated retrospective comparative analysis of CALGB 9712 and CALGB 9011. *Blood* 2005 ;105(1):49-53.
- (37) Krams M, Hero B, Berthold F, Parwaresch R, Harms D, Rudolph P. Proliferation marker KI-S5 discriminates between favorable and adverse

prognosis in advanced stages of neuroblastoma with and without MYCN amplification. *Cancer* 2002 February 1;94(3):854-61.

- (38) Oka S, Uramoto H, Shimokawa H, Iwanami T, Tanaka F. The expression of Ki-67, but not proliferating cell nuclear antigen, predicts poor disease free survival in patients with adenocarcinoma of the lung. *Anticancer Res* 2011;31(12):4277-82.
- (39) Tolonen TT, Tammela TL, Kujala PM, Tuominen VJ, Isola JJ, Visakorpi T. Histopathological variables and biomarkers enhancer of zeste homologue 2, Ki-67 and minichromosome maintenance protein 7 as prognosticators in primarily endocrine-treated prostate cancer. *BJU Int* 2011;108(9):1430-8.
- (40) Evans C, Morrison I, Heriot AG, Bartlett JB, Finlayson C, Dalglish AG, Kumar D. The correlation between colorectal cancer rates of proliferation and apoptosis and systemic cytokine levels; plus their influence upon survival. *Br J Cancer* 2006 22;94(10):1412-9.
- (41) Valera V, Yokoyama N, Walter B, Okamoto H, Suda T, Hatakeyama K. Clinical significance of Ki-67 proliferation index in disease progression and prognosis of patients with resected colorectal carcinoma. *Br J Surg* 2005;92(8):1002-7.
- (42) Valera VA, Walter BA, Yokoyama N, Koyama Y, Iiai T, Okamoto H, Hatakeyama K. Prognostic groups in colorectal carcinoma patients based on tumor cell proliferation and classification and regression tree (CART) survival analysis. *Ann Surg Oncol* 2007;14(1):34-40.
- (43) Oshima CT, Iriya K, Forones NM. Ki-67 as a prognostic marker in colorectal cancer but not in gastric cancer. *Neoplasma* 2005;52(5):420-4.
- (44) Petrowsky H, Sturm I, Graubitz O, Kooby DA, Staib-Sebler E, Gog C, Kohne CH, Hillebrand T, Daniel PT, Fong Y, Lorenz M. Relevance of Ki-67 antigen expression and K-ras mutation in colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 2001;27(1):80-7.

- (45) Hilska M, Collan YU, VJ OL, Kossi J, Hirsimaki P, Laato M, Roberts PJ. The significance of tumor markers for proliferation and apoptosis in predicting survival in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2005;48(12):2197-208.
- (46) Garrity MM, Burgart LJ, Mahoney MR, Windschitl HE, Salim M, Wiesenfeld M, Krook JE, Michalak JC, Goldberg RM, O'Connell MJ, Furth AF, Sargent DJ, Murphy LM, Hill E, Riehle DL, Meyers CH, Witzig TE. Prognostic value of proliferation, apoptosis, defective DNA mismatch repair, and p53 overexpression in patients with resected Dukes' B2 or C colon cancer: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol* 2004;22(9):1572-82.
- (47) Salminen E, Palmu S, Vahlberg T, Roberts PJ, Soderstrom KO. Increased proliferation activity measured by immunoreactive Ki67 is associated with survival improvement in rectal/recto sigmoid cancer. *World J Gastroenterol* 2005;11(21):3245-9.
- (48) Hilska M, Collan YU, VJ OL, Kossi J, Hirsimaki P, Laato M, Roberts PJ. The significance of tumor markers for proliferation and apoptosis in predicting survival in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2005;48(12):2197-208.
- (49) Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH, Parr AL, Kirsch I, Kim G, Klein P, Johnston PG, Wolmark N, Wieand HS. Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study. *J Clin Oncol* 2003;21(2):241-50.
- (50) Fluge O, Gravdal K, Carlsen E, Vonen B, Kjellevold K, Refsum S, Lilleng R, Eide TJ, Halvorsen TB, Tveit KM, Otte AP, Akslen LA, Dahl O. Expression of EZH2 and Ki-67 in colorectal cancer and associations with treatment response and prognosis. *Br J Cancer* 2009;101(8):1282-9.
- (51) Bahnassy AA, Zekri AR, El-Houssini S, El-Shehaby AM, Mahmoud MR, Abdallah S, El-Serafi M. Cyclin A and cyclin D1 as significant prognostic markers in colorectal cancer patients. *BMC Gastroenterol* 2004 ;4:22.:22.

- (52) Allegra CJ, Parr AL, Wold LE, Mahoney MR, Sargent DJ, Johnston P, Klein P, Behan K, O'Connell MJ, Levitt R, Kugler JW, Tria TM, Goldberg RM. Investigation of the prognostic and predictive value of thymidylate synthase, p53, and Ki-67 in patients with locally advanced colon cancer. *J Clin Oncol* 2002;20(7):1735-43.
- (53) Scopa CD, Tsamandas AC, Zolota V, Kalofonos HP, Batistatou A, Vagianos C. Potential role of bcl-2 and ki-67 expression and apoptosis in colorectal carcinoma: a clinicopathologic study. *Dig Dis Sci* 2003;48(10):1990-7.
- (54) Huh JW, Lee JH, Kim HR. Expression of p16, p53, and Ki-67 in colorectal adenocarcinoma: a study of 356 surgically resected cases. *Hepatogastroenterology* 2010;57(101):734-40.
- (55) Valera V, Yokoyama N, Walter B, Okamoto H, Suda T, Hatakeyama K. Clinical significance of Ki-67 proliferation index in disease progression and prognosis of patients with resected colorectal carcinoma. *Br J Surg* 2005;92(8):1002-7.
- (56) Coenen C, Bauer KH, Uffmann M, Wedmann B, Zumtobel V. [The prognostic relevance of tumor localization in colorectal cancer. A multivariate analysis]. *Z Gastroenterol* 1989;27(11):683-5.
- (57) Emmrich P, Holzer H. [Tumor genesis and prognostic factors in colorectal carcinoma with special consideration of tumor localization]. *Zentralbl Chir* 1999;124(12):1079-86.
- (58) Meguid RA, Slidell MB, Wolfgang CL, Chang DC, Ahuja N. Is there a difference in survival between right- versus left-sided colon cancers? *Ann Surg Oncol* 2008;15(9):2388-94.
- (59) Hemminki K, Santi I, Weires M, Thomsen H, Sundquist J, Bermejo JL. Tumor location and patient characteristics of colon and rectal adenocarcinomas in relation to survival and TNM classes. *BMC Cancer* 2010;10:688.:688.

- (60) Newland RC, Chapuis PH, Pheils MT, MacPherson JG. The relationship of survival to staging and grading of colorectal carcinoma: a prospective study of 503 cases. *Cancer* 1981;47(6):1424-9.
- (61) Kreisholt J, Sorensen M, Jensen PB, Nielsen BS, Andersen CB, Sehested M. Immunohistochemical detection of DNA topoisomerase IIalpha, P-glycoprotein and multidrug resistance protein (MRP) in small-cell and non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 1998;77(9):1469-73.
- (62) Dingemans AM, Witlox MA, Stallaert RA, van d, V, Postmus PE, Giaccone G. Expression of DNA topoisomerase IIalpha and topoisomerase IIbeta genes predicts survival and response to chemotherapy in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5(8):2048-58.
- (63) Al-Kuraya K, Novotny H, Bavi P, Siraj AK, Uddin S, Ezzat A, Sanea NA, Al-Dayel F, Al-Mana H, Sheikh SS, Mirlacher M, Tapia C, Simon R, Sauter G, Terracciano L, Tornillo L. HER2, TOP2A, CCND1, EGFR and C-MYC oncogene amplification in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2007;60(7):768-72.
- (64) Fogt F, Nikulasson ST, Holden JA, Alder SA, Hallgrimsson J, Jessup MJ, O'Brien MJ, Lavin PT, Goldman H. Topoisomerase II alpha expression in normal, inflammatory, and neoplastic conditions of the gastric and colonic mucosa. *Mod Pathol* 1997 ;10(4):296-302.
- (65) Staley BE, Samowitz WS, Bronstein IB, Holden JA. Expression of DNA topoisomerase I and DNA topoisomerase II-alpha in carcinoma of the colon. *Mod Pathol* 1999;12(4):356-61.
- (66) Boonsong A, Curran S, McKay JA, Cassidy J, Murray GI, McLeod HL. Topoisomerase I protein expression in primary colorectal cancer and lymph node metastases. *Hum Pathol* 2002 ;33(11):1114-9.
- (67) Mendez J, Stillman B. Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol* 2000;20(22):8602-12.



- (68) Ritzi M, Baack M, Musahl C, Romanowski P, Laskey RA, Knippers R. Human minichromosome maintenance proteins and human origin recognition complex 2 protein on chromatin. *J Biol Chem* 1998;273(38):24543-9.
- (69) Lindner K, Gregan J, Montgomery S, Kearsey SE. Essential role of MCM proteins in premeiotic DNA replication. *Mol Biol Cell* 2002;13(2):435-44.
- (70) Yankulov K, Todorov I, Romanowski P, Licatalosi D, Cilli K, McCracken S, Laskey R, Bentley DL. MCM proteins are associated with RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell Biol* 1999;19(9):6154-63.
- (71) You Z, Komamura Y, Ishimi Y. Biochemical analysis of the intrinsic Mcm4-Mcm6-mcm7 DNA helicase activity. *Mol Cell Biol* 1999;19(12):8003-15.
- (72) Ishimi Y. A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *J Biol Chem* 1997 ;272(39):24508-13.
- (73) Stoeber K, Tlsty TD, Happerfield L, Thomas GA, Romanov S, Bobrow L, Williams ED, Williams GH. DNA replication licensing and human cell proliferation. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 11):2027-41.
- (74) Meng MV, Grossfeld GD, Williams GH, Dilworth S, Stoeber K, Mulley TW, Weinberg V, Carroll PR, Tlsty TD. Minichromosome maintenance protein 2 expression in prostate: characterization and association with outcome after therapy for cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7(9):2712-8.
- (75) Gonzalez MA, Tachibana KE, Chin SF, Callagy G, Madine MA, Vowler SL, Pinder SE, Laskey RA, Coleman N. Geminin predicts adverse clinical outcome in breast cancer by reflecting cell-cycle progression. *J Pathol* 2004;204(2):121-30.
- (76) Ramnath N, Hernandez FJ, Tan DF, Huberman JA, Natarajan N, Beck AF, Hyland A, Todorov IT, Brooks JS, Bepler G. MCM2 is an independent predictor of survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2001;19(22):4259-66.

- (77) Guida T, Salvatore G, Faviana P, Giannini R, Garcia-Rostan G, Provitera L, Basolo F, Fusco A, Carlomagno F, Santoro M. Mitogenic Effects of the Up-regulation of Minichromosome Maintenance (MCM) Proteins in Anaplastic Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 17;.
- (78) Dudderidge TJ, Stoeber K, Loddo M, Atkinson G, Fanshawe T, Griffiths DF, Williams GH. Mcm2, Geminin, and Ki67 define proliferative state and are prognostic markers in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(7):2510-7.
- (79) Ha SA, Shin SM, Namkoong H, Lee H, Cho GW, Hur SY, Kim TE, Kim JW. Cancer-associated expression of minichromosome maintenance 3 gene in several human cancers and its involvement in tumorigenesis. *Clin Cancer Res* 2004;10(24):8386-95.
- (80) Nishihara K, Shomori K, Tamura T, Fujioka S, Ogawa T, Ito H. Immunohistochemical expression of geminin in colorectal cancer: Implication of prognostic significance. *Oncol Rep* 2009;21(5):1189-95.

## **Danksagung**

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. habil. Carsten Schrader gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die Organisation eines Arbeitsplatzes und des Untersuchungsgutes sowie für seine sympathische Art, stetige Unterstützung und Betreuung bei dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. U.R. Fölsch, ehemaliger Direktor und Herrn Prof. Dr. S. Schreiber, Direktor der Klinik für Innere Medizin I, UKSH Campus Kiel, danke ich für die Möglichkeit die vorliegende Dissertation in ihrer Klinik durchführen zu können.

Herrn Dr. J. Classen ehemals I. Medizinische Klinik, aktuell Klinik Neurologie Uniklinikum Dresden, für seine Hilfe bei der Erstellung der Datenbank.

Herrn Prof. Dr. G. Klöppel, ehemals Direktor und Herrn Prof. Dr. B. Sipos ehemals Oberarzt, Institut für Pathologie der Universitätsklinikum, UKSH Campus Kiel für ihre Unterstützung bei der Ermöglichung der Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. habil. J. Bräsen, leitender Oberarzt des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums UKSH, Campus Kiel danke ich für seine stetige Unterstützung bei der Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen, der Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. W. Klapper, Leiter der Sektion für Hämatopathologie und Lymphknotenregisters Kiel danke ich für die Bereitstellung der Antikörper Ki-S4 und Ki-MCM6 sowie bei der Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen.

Ich danke Herrn Dr. T. Raff, II. Medizinische Klinik, für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. R. Lucius, anatomisches Institut Uni Kiel danke ich für seine Unterstützung bei der Anfertigung der Schnittpräparate.

Herrn Prof. Dr. F. Gieseler, ehemals Oberarzt der I. Medizinische UKSH, Campus Kiel, jetzt Medizinische Klinik, UKSH Campus Lübeck danke ich für die Bereitstellung der klinischen Daten.

Herrn Dr. H. Held FEK-Krankenhaus, onkologische Abteilung Neumünster für seine Hilfe bei Datenerhebung der Patienten aus Neumünster.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. habil. C. Schafmeyer, Herrn Prof. Dr. H. Kalthoff, Herrn Dr. S. Hinz und Herrn Dr. W. von Schönfels, Klinik für Allgemeine Chirurgie UKSH, Campus Kiel danke ich für deren große Unterstützung bei der Erhebung und Aktualisierung der Patientendaten.

Herrn M. Weiß, MTA, pathologisches Institut, UKSH Campus Kiel danke ich für die engagierte Hilfe bei der immunhistochemischen Färbung sowie die MTAs des anatomischen Institutes bei der Unterstützung bei der Anfertigung der Schnittpräparate.

Meinem Freund Dr. Muhammed Ayub danke ich für die Schreibkorrektur dieser Dissertation.

Ein letzter besonderer herzlicher Dank gilt meinen Eltern und meiner lieben Frau Afaf, die mich immer inspiriert haben, und ohne deren stetige Unterstützung ich diese Arbeit nicht vollbracht wäre.

## Lebenslauf

<b>Persönliche Daten:</b>	Saleh Muhammed Nazzal geb. 15.01.1984 in Zefat verheiratet/ 2 Kinder
<b>Staatsangehörigkeit:</b>	israelisch
<b>Sprachkenntnisse:</b>	Deutsch, Arabisch, Hebräisch, Englisch
<b>Ausbildung:</b>	07/ 2002 Abiturabschluss an Mar Elias Gymnasium“  02/ 2004 Prüfungsnachweis der deutschen Sprachkenntnisse (PNDS-Prüfung), CAU-Kiel  04/ 2004 Chemie Studium, CAU-Kiel  10/ 2004 – 10/ 2010 Studium der Humanmedizin an der CAU zu Kiel  08/ 2006 1.Staatsexamen der Medizin 10/ 2010 2.Staatsexamen der Medizin  02/2011 Israelische Staatsexamen 07/2011- 06/2012 Arzt in Praktikum (Israel) 10/2012- jetzt Assistenzarzt Notfallmedizin- Poria-Medical Center (Israel)
<b>Praktisches Jahr (PJ):</b>	<b>08/2009- 07/2010</b>  Radiologie UKSH, Campus Kiel Chirurgie, UKSH, Campus Kiel Chirurgie Uni-Haifa (Israel) I. und III. Medizinische Klinik, Städtisches Krankenhaus-Kiel
<b>Studienabschluss:</b>	<b>26/10/2010 2.Staatsexamen der Medizin</b>
<b>Zusätzliche Tätigkeiten:</b>	11/2006- 12/2010 Extrawache Kompass-Reha-Klinik, Kiel  03/ 2008 -12/2010 Dolmetscher, International Ward, UKSH, Kiel

**Promotion:**

ab 10/2007

Beginn der Dissertationsarbeit, I. Medizinische Klinik,  
UKSH, Campus Kiel mit dem Thema

„Topoisomerase II $\alpha$  und Minichromosome

Maintenance Proteine 6 Expression im kolorektalen

Karzinom: eine klinisch – Immunhistochemische

Untersuchung von 619 Patienten“

Kiel, den 10.03.2012

## Schriftenverzeichnis

- [1] Schrader C, Gieseler F, Bräsen JH, Sipos B, Klapper W, Kalthoff H, von Schönfels W, Lucius R, Pflüger C, Hinz S, Held H, Raff T, Klöppel G, Claasen J, **Nazzal S**, Schafmayer C (2011) Proliferation associated Minichromosome Maintenance Protein 6 (MCM 6) Expression In Colorectal Cancer: A Proliferationmarker And A Prognostic Factor For Clinical Outcome. Ann Oncol: **22:** (Suppl.5) #341
- [2] Schrader C, Gieseler F, Bräsen JH, Sipos B, Klapper W, Kalthoff H, von Schönfels W, Lucius R, Pflüger C, Hinz S, Held H, Raff T, Klöppel G, Claasen J, **Nazzal S**, Schafmayer C (2011). Topoisomerase II alpha Expression in Colorectal Cancer: a Marker of Cell Proliferation and a Prognostic Factor for Clinical Outcome. Ann Oncol: **22:** (Suppl.5) #343
- [3] Schrader C, Gieseler F, Bräsen JH, **Nazzal S**, Sipos B, Klapper W, Kalthoff H, von Schönfels W, Lucius R, Pflüger C, Hinz S, Held H, Raff T, Klöppel G, Claasen J, Schafmayer C (2011) Topoisomerase II alpha Expression im Kolorektalen Karzinom: eine klinisch pathologische Untersuchung an 430 Tumorproben. Z Gastroenterol: **49:** #119
- [4] Schrader C, Gieseler F, Bräsen JH, **Nazzal S**, Sipos B, Klapper W, Kalthoff H, von Schönfels W, Lucius R, Pflüger C, Hinz S, Held H, Raff T, Klöppel G, Claasen J, Schafmayer C (2011). Minichromosome Maintenance protein 6 (MCM6) Expression im Kolorektalen Karzinom: Ein Proliferationsmarker und neuer Prognosefaktor. Z Gastroenterol: **49:** #120
- [5] Schrader C, Gieseler F, Bräsen JH, Sipos B, Klapper W, Kalthoff H, von Schönfels W, , Pflüger C, Hinz S, Held H, Raff T, Klöppel G, Claasen J, **Nazzal S**, Schafmayer C (2011) Minichromosome Maintenance Protein 6 (MCM 6) Expression In Colorectal Cancer: A Proliferationmarker And A Prognostic Factor For Clinical Outcome. Onkologie: **34:** (Suppl.6) #837

- [6] Schrader C, Gieseler F, Bräsen JH, Sipos B, Klapper W, Kalthoff H, von Schönfels W, Lucius R, Pflüger C, Hinz S, Held H, Raff T, Klöppel G, Claasen J, **Nazzal S**, Schafmayer C (2011). Topoisomerase II alpha Expression in Colorectal Cancer: a clinicopathological investigation of 430 tumor specimens. Onkologie: **34**: (Suppl.6) #838
- [7] Schafmayer C, Gieseler F, Bräsen JH, Sipos B, Klapper W, Kalthoff H, von Schönfels W, , Pflüger C, Hinz S, Held H, Raff T, Klöppel G, Claasen J, **Nazzal S**, Schrader C (2012) Minichromosome Maintenance Protein 6 (MCM 6) Expression im Kolonkarzinom: Ein Proliferationsmarker und Prognosefaktor. (eingereicht bei DGCH)
- [8] Schafmayer C, Gieseler F, Bräsen JH, Sipos B, Klapper W, Kalthoff H, von Schönfels W, Lucius R, Pflüger C, Hinz S, Held H, Raff T, Klöppel G, Claasen J, **Nazzal S**, Schrader C, (2012). Topoisomerase II alpha Expression im Kolonkarzinom: eine klinisch pathologische Untersuchung an 430 Tumorproben. (eingereicht bei DGCH)
- [9] Schrader C, Gieseler F, Bräsen JH, Sipos B, Klapper W, Kalthoff H, von Schönfels W, , Pflüger C, Hinz S, Held H, Raff T, Klöppel G, Claasen J, **Nazzal S**, Schafmayer C (2012) Minichromosome Maintenance Protein 6 (MCM 6) Expression In Colorectal Cancer: A Proliferationmarker And A Prognostic Factor For Clinical Outcome. Der Pathologe
- [10] Schrader C, Gieseler F, Bräsen JH, Sipos B, Klapper W, Kalthoff H, von Schönfels W, Lucius R, Pflüger C, Hinz S, Held H, Raff T, Klöppel G, Claasen J, **Nazzal S**, Schafmayer C (2012). Topoisomerase II alpha Expression in Colorectal Cancer: a clinicopathological investigation of 430 tumor specimens. Der Pathologe